



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Orgánica



MIMÉTICOS DE GPE Y cPG

¿UNA NUEVA FAMILIA DE AGENTES

NEUROPROTECTORES?

TESIS DOCTORAL

SERGIO-ALVAR ALONSO DE DIEGO

Madrid, 2007



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Orgánica



MIMÉTICOS DE GPE Y cPG

¿UNA NUEVA FAMILIA DE AGENTES

NEUROPROTECTORES?

TESIS DOCTORAL

SERGIO-ALVAR ALONSO DE DIEGO

Directoras: Dra. M^a Teresa García-López y
Dra. M^a Luisa Jimeno Herranz
Madrid, 2007

El trabajo descrito en la presente Memoria ha sido realizado en el Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y ha sido posible gracias a la beca predoctoral CSIC-Unidades Asociadas Universidades, que me fue concedida conjuntamente por el CSIC y el Ministerio de Educación y Ciencia, instituciones a las que quisiera expresar mi agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras de Tesis, las Doctoras M^a Teresa García López y M^a Luisa Jimeno Herranz, no sólo la oportunidad que me dieron hace ya cinco años de poder realizar este trabajo, si no la dedicación que han mostrado en todo momento, sus numerosas ideas, su interés, su ayuda en los momentos más cuesta arriba, sus consejos tanto personales como profesionales, y, sobre todo, el apoyo, confianza y cariño que me han dado desde el primer día.

También agradecer a los miembros del grupo de investigación, las Dras. Rosario Herranz, Rosario González Muñiz y Mercedes Martín por su interés, consejos e inestimable ayuda, y, especialmente, a la Dra. M^a Jesús Pérez de Vega, además de por todo lo anterior, por echarme una mano con la fase sólida y por su amena compañía en el laboratorio durante el último periodo.

Al Dr. Joaquín del Río Zambrana y su grupo de investigación en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Navarra, por la eficaz realización de los ensayos de afinidad por receptores de glutamato y de neuroprotección.

A todo el personal de los servicios técnicos del centro de Química Orgánica Manuel Lora Tamayo: RMN, espectrometría de masas y microanálisis, que con su buen hacer han colaborado en diferentes aspectos de esta Memoria. Especialmente, a Dña. M^a Dolores Casado, a Dña. Mercedes Plaza, a D. Pablo Espina, y particularmente, a Araceli, Juanma y Alberto, por haber tenido también una pequeña amistad.

A la Dra. Pilar Goya, directora del Instituto de Química Médica, por las facilidades dadas en todo momento.

A M^a Ángeles Cano, Juan Carlos y M^a Luisa, por su ayuda con todos los pesados papeleos y por su eficaz labor administrativa.

Al Dr. José Luis García Ruano que me permitió comenzar en el mundo de la investigación, y a la Dra. Ana M^a Martín Castro, por lo que aprendí durante los dos años que estuve con ellos, y por su ayuda y consejos durante este tiempo lejos de la Universidad.

Muy especialmente, estos agradecimientos van dirigidos a las personas con las que más contacto he tenido en estos años, sobre todo, puertas afuera. A Javi, Mariana,

Carmen, Rusé y David, por ser la primera amistad que me llevé de aquí. Por los cafés, comidas, sobremesas, paradiñas y saliditas que nos pegamos (y ahora bodas...), y, sobre todo, por que se sigan repitiendo.

A mis compañeros de andanzas que han pasado por el laboratorio, en especial a Maribel, por su simpatía, buen humor, compañía y paciencia con el HPLC (no es más fuerte que tu!). A Paula, Pili y Marta, por vuestra amistad y por la vidilla y alegría que le habéis dado al grupo desde que llegasteis. A Mayte, por todos sus consejos desde que la conocí, que ya hace, y por las que hemos liado con los de la Autónoma. A Nono, por la amistad que tuvimos y las risas que nos echamos en su día. A las gemeloides, M^a Ángeles y M^a Cruz, por su cariño y simpatía. A Susana por su ya no tan reciente compañía en el laboratorio. A los recién llegados al grupo, Diego y Ángel. Y a Jose, por su amistad, sus buenos consejos profesionales, las quedadas al salir del laboratorio, por las pelás que le gané al póker en su casa, por su particular forma de ver las cosas y, también, por ser un poco paletillo.

También agradecer al grupito que hemos ido creando últimamente tanto para comer como para otros momentos de ocio: Pedro, Vicente, Ángela, Virginia, Fernando, Chi, y Carlos, por su compañía, su ayuda y sus consejos para terminar este trabajo. A Cumella, por su amistad y por ser el más liante. Y a Felipe, el veterano, por sus consejos, su amistad, por la comilona de su Tesis y, según él, sus coberturas.

Por supuesto, a otras personas del centro que siempre han estado dispuestos a echar una mano y con los que he compartido buenos momentos a lo largo de este tiempo. Susana, Olguita, Gema, Kika, Arantxa, Tania, Alessandra, Paula, Mayte, Cristina, Alberto, Vicente, Elena, Leire, Olga, Carlitos, Sonia, Valen, los irlandeses que pasaron por el grupo y más gente que han tenido algo que ver con este trabajo a los cuales agradezco sinceramente.

A Tato, Tati, Marga y Andrés con todo mi cariño.

A mis coleguitas de toda la vida, por el apoyo mostrado en todo momento y porque, aunque no entienden cómo una Tesis se puede alargar tanto, se alegran tanto como yo de que vaya llegando el final. En especial, a Antonio, por haber compartido el mismo duro camino.

Y, finalmente, a mi familia, especialmente a mis padres y mi hermana... imagino que por todo (o casi ☺).

Por todo ello, y muchas cosas más, muchas gracias.

ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
NOTA SOBRE PUNTUACIÓN.....	8
NOTA SOBRE NOMENCLATURA.....	8
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. EL TRIPÉPTIDO <i>N</i> -TERMINAL DEL FACTOR TRÓFICO IGF-1, Gly-Pro-Glu (GPE) Y EL DIPÉPTIDO CÍCLICO ciclo(Pro-Gly) (cPG).....	13
1.2. POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LOS PÉPTIDOS. PEPTIDOMIMÉTICOS.....	18
1.3. PIPERAZINAS Y OXOPIPERAZINAS COMO ESTRUCTURAS PRIVILEGIADAS.....	28
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	33
3. RESULTADOS.....	37
3.1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE GPE.....	39
3.1.1. Rasgos conformacionales.....	39
3.1.2. Metodología utilizada.....	43
3.1.2.1. Simulación por dinámica molecular.....	43
3.1.2.2. Estudios por RMN.....	44
3.1.3. Discusión de resultados.....	48
Rotamería conformacional en torno al enlace Gly-Pro.....	48
Equilibrio conformacional del anillo de pirrolidina.....	49
El residuo de glutámico y el esqueleto peptídico.....	55

3.2. TRIPÉPTIDOS ANÁLOGOS DE GPE	62
3.2.1. Síntesis de análogos de GPE modificados en el residuo de glicina....	65
3.2.2. Síntesis de análogos de GPE modificados en el residuo de glutámico	69
3.2.3. Síntesis de análogos de GPE modificados en el residuo de prolina....	71
3.2.4. Evaluación farmacológica.....	79
3.3. PSEUDOTRIPÉPTIDOS ANÁLOGOS DE GPE.....	85
3.3.1. Pseudotripéptidos metilnamino $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$	87
3.3.2. Pseudotripéptidos cianometilnamino $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$	89
3.3.3. Evaluación farmacológica.....	93
3.4. APLICACIÓN DE PSEUDODIPÉPTIDOS DERIVADOS DE Gly $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]\text{Glu}$ A LA SÍNTESIS DE OXOPIPERAZINAS Y DERIVADOS BICÍCLICOS.....	97
3.4.1. Síntesis.....	100
3.4.2. Evaluación farmacológica.....	104
3.5. OXOPIPERAZINAS BICÍCLICAS ANÁLOGAS DE cPG.....	105
3.5.1. Síntesis de dipéptidos cíclicos análogos de cPG. Derivados de 2,5-dicetopiperazinas bicíclicas.....	105
3.5.2. Síntesis de pseudodipéptidos cíclicos $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ y $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ análogos de cPG. Derivados de 2-oxopiperazinas bicíclicas.....	108
1-Oxoperhidropirrol[1,2- <i>a</i>]pirazinas: Pseudodipéptidos cíclicos derivados de ciclo(Gly $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]\text{Pro}$).....	109
4-Oxoperhidropirrol[1,2- <i>a</i>]pirazinas: Pseudodipéptidos cíclicos derivados de ciclo(Pro $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]\text{Gly}$).....	114
3.5.3. Evaluación farmacológica.....	115
4. CONCLUSIONES.....	119
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	125
5.1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE GPE.....	127
5.1.1. Espectroscopía de RMN.....	127
5.1.2. Estudios de mecánica y dinámica molecular.....	128
5.2. SÍNTESIS.....	130

5.2.1. Métodos generales.....	130
5.2.2. Procedencia de productos comerciales.....	132
5.2.3. Síntesis de productos de partida conocidos.....	135
5.2.4. Procedimientos generales de síntesis.....	139
5.2.4.1. Síntesis de péptidos en fase sólida.....	139
5.2.4.2. Síntesis de péptidos en disolución.....	141
5.2.5. Síntesis de tripéptidos.....	143
5.2.5.1. Síntesis de AA ₁ -Pro-Glu.....	143
Síntesis en fase sólida.....	143
Síntesis en disolución.....	148
5.2.5.2. Síntesis de Gly-Pro-AA ₃ en disolución.....	151
5.2.5.3. Síntesis de Gly-AA ₂ -Glu.....	159
Síntesis en fase sólida.....	159
Síntesis en disolución.....	165
5.2.6. Síntesis de pseudopéptidos.....	177
5.2.6.1. Pseudopéptidos metilnamino $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$	177
5.2.6.2. Pseudopéptidos cianometilnamino $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$	183
5.2.7. Síntesis de oxopiperazinas y derivados bicíclicos.....	195
5.2.7.1. 2-Oxopiperazinas, 1,6-Dioxoperhidropirrol[1,2- <i>a</i>]- pirazinas y 3,7-Dioxoperhidropirazino[1,2- <i>a</i>]pirazinas.....	195
5.2.7.2. Dipéptidos y pseudodipéptidos cíclicos.....	202
1,4-Dioxoperhidropirrol[1,2- <i>a</i>]pirazinas, 5,8-dioxoperhidrotia- zolo[3,4- <i>a</i>]pirazina y 1,4-dioxoperhidropirido[1,2- <i>a</i>]pirazinas....	202
1-Oxoperhidropirrol[1,2- <i>a</i>]pirazinas.....	207
4-Oxoperhidropirrol [1,2- <i>a</i>]pirazinas.....	212
5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.....	214
5.3.1. Fijación a receptores de GluRs.....	214
5.3.2. Neuroprotección en cultivos celulares.....	215
5.4. APÉNDICE: DATOS DE ANÁLISIS DE COMBUSTIÓN.....	217
6. BIBLIOGRAFÍA.....	223

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de numeración inglesa, este sistema de numeración se ha utilizado también en esta Memoria. Es decir, las cifras decimales se indican con punto en lugar de con coma.

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se ha utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB (“Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides”, *Pure & Appl. Chem.* **1994**, 56, 595-674. <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/iubmb.html#03>).

Los aminoácidos se han nombrado por el sistema de símbolos de tres letras y pertenecen a la serie natural L, salvo que se indique lo contrario. Las sustituciones en el grupo α -NH₂ se indican anteponiendo el símbolo aceptado para el sustituyente al símbolo del aminoácido, mientras que las sustituciones en los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina *N*-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina *C*-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo *N*-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo *C*-terminal.

Para las sustituciones del enlace peptídico por agrupamientos bioisósteros se utiliza la terminología aceptada para pseudopéptidos, consistente en la introducción de la letra griega Ψ entre los símbolos de los aminoácidos cuyo enlace peptídico se ha modificado, seguida del agrupamiento que sustituye al enlace peptídico entre corchetes.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en *Guidelines for Authors (J. Org. Chem.* **2007**, 72, 23A), además de los indicados a continuación:

AA _n	Aminoácido
Alloc	Aliloxicarbonilo
AMBER	“Assisted Model Building with Energy Refinement”
AMPA	α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
(<i>R</i>)-AP5	(2 <i>R</i>)-2-Amino-5-fosfonopentanoico
BOP	Hexafluoruro de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)-fosfonio
Δ	Calefacción
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	Diisopropiletilamina
eq	equivalentes
EM	Espectrometría de masas
EM-ES	Espectrometría de masas por ionización con electrospray
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HATU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-uronio
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC-MS	HPLC acoplado a un espectrómetro de masas
IH	Isquemia hipóxica

May	Mayoritario
min	minoritario, minutos
(<i>R</i>)-Cl-MTPA	Cloruro de (<i>R</i>)- α -metoxi- α -trifluorometilfenil acetilo
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NMDA	<i>N</i> -Metil-D-Aspártico
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
P.f.	Punto de fusión
ppb	Partes por billón
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
PyAOP	Hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris(pirrolidin)-fosfonio
Rdto.	Rendimiento
RMN	Resonancia magnética nuclear
t. a.	Temperatura ambiente
TFE	Trifluoroetanol
TMSCN	Cianuro de trimetilsililo
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana Tipo 1
Z	Benciloxicarbonilo

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL TRIPÉPTIDO N-TERMINAL DEL FACTOR TRÓFICO IGF-1, Gly-Pro-Glu (GPE) Y EL DIPÉPTIDO CÍCLICO ciclo(Pro-Gly) (cPG)

En la última década, el papel neuroprotector del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1) en distintos tipos de agresiones experimentales relacionadas con procesos neurodegenerativos ha sido objeto de intensos estudios, habiéndose observado que estos procesos están asociados, entre otros factores, a cambios en los niveles de IGF-1^{1, 2, 3}. En este sentido, son de destacar los resultados del grupo de Torres-Alemán, indicativos del papel regulador que desempeña este factor trófico en los niveles cerebrales del péptido β -amiloide, implicado en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, y que, por tanto, remarcan su potencial terapéutico⁴. Asimismo, existe evidencia creciente de que este péptido ejerce sus efectos centrales mediante dos mecanismos diferentes, consecuencia de su ruptura enzimática para dar lugar a dos fragmentos, ambos con propiedades neuroprotectoras (Figura 1.1). Por una parte, el fragmento truncado (des 1-3)IGF-1, cuya acción está mediada por el mismo receptor que el IGF-1 (IGF-1R) y que muestra efectos neuroprotectores mucho menores que los del péptido completo, y, por otra, el tripéptido N-terminal Gly-Pro-Glu (GPE, **1**), cuyo mecanismo está aún por clarificar, si bien se conoce que no interacciona con el citado receptor^{5, 6}.

Este tripéptido muestra diversas acciones reguladoras en el cerebro. Así, GPE es capaz de modular la liberación de ciertos neurotransmisores, siendo un potente

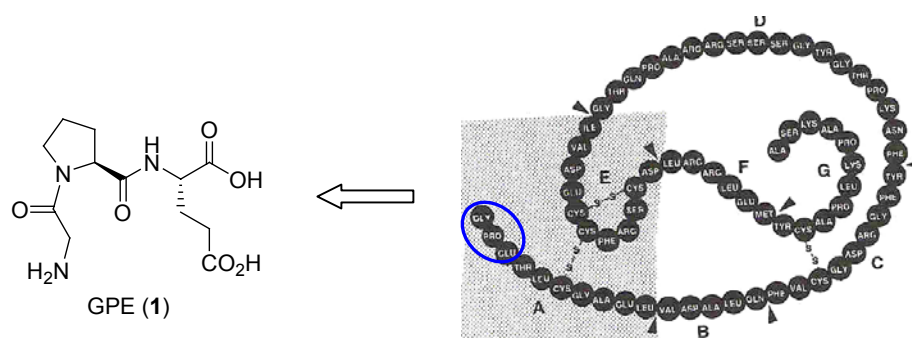


Figura 1.1. Ruptura enzimática de IGF-1 para dar lugar a GPE.

estimulador de la liberación de acetilcolina inducida por potasio en la corteza cerebral, y de dopamina en el estriado⁵. Además, la administración exógena de GPE previene la muerte neuronal inducida por NMDA, ácido quinolínico, IH o 6-OHDA en diferentes regiones del cerebro^{7, 8, 9, 10}. En un modelo animal de la enfermedad de Huntington, GPE es capaz de prevenir la degeneración de los tres fenotipos principales de neuronas del estriado, las neuronas GABA-érgicas, las interneuronas colinérgicas y las interneuronas NADPHd⁸. Adicionalmente, estudios en distintos modelos experimentales sugieren que la administración de GPE ejerce efectos neuroprotectores después de procesos isquémicos así como que es capaz de prevenir la pérdida de neuronas inmunopositivas a tirosina hidroxilasa, en un modelo animal de enfermedad de Parkinson^{6, 9, 10}.

En cuanto al mecanismo de acción a través del cual GPE ejerce sus efectos biológicos se ha sugerido que su fijación a células gliales podría conducir a la liberación de agentes neuroprotectores⁶. Por otra parte, también se conoce que este péptido endógeno, además de no fijarse a IGF-1R, tampoco interacciona directamente ni con los receptores AMPA, ni kainato, ni con los mecanismos de recaptación de glutamato. Sin embargo, se ha demostrado que GPE es capaz de desplazar la unión de glutamato tritiado a membranas del cerebro anterior y a sinaptosomas hipotalámicos¹¹, hecho que sugiere una posible interacción con los receptores NMDA. En este sentido, se ha postulado que GPE puede actuar como antagonista de dichos receptores^{6, 12}. No obstante, se desconoce hasta que punto es capaz de unirse a las diferentes subunidades de los receptores NMDA, así como la posible existencia de otros receptores específicos para este péptido endógeno.

GPE está siendo desarrollado, bajo el nombre de “Glypromate”, por Neuren Pharmaceuticals en Auckland (Nueva Zelanda), empresa que ha comunicado recientemente la finalización satisfactoria de la fase II, como neuroprotector frente a problemas cognitivos derivados de cirugía cardíaca con *by pass* (cardiac by pass graft surgery, CABG) como primera aplicación clínica (www.neurenpharm.com).

Aunque se desconoce, hasta el momento, la presencia de un sistema enzimático específico de degradación metabólica de GPE, se conoce que este tripéptido tiene una vida media muy corta, degradándose rápidamente *in vivo* por peptidasas por lo que la inyección intravenosa continua parece ser la vía de administración más adecuada¹³. Neuronz Ltd en colaboración con investigadores de la Universidad de Auckland han descrito que GPE se metaboliza primero a Gly-Pro y posteriormente a sus aminoácidos integrantes¹³. Sin embargo, en la patente de aplicación WO 03/041655¹⁴ se afirma, aunque sin aportar experimento demostrativo alguno, que el dipéptido cíclico, ciclo(Pro-Gly) (cPG, **2**, Figura 1.2), es, junto con el ácido glutámico, el último metabolito del GPE, reivindicándose para esta dicetopiperazina potentes efectos neuroprotectores, tanto en esta patente como en otra publicada por Neuronz^{14, 15}. Así, describen que cPG previene y revierte la neurotoxicidad inducida por glutamato en neuronas del cerebelo de rata, e induce la regeneración de nervios y neuritas. Además, mejora, de forma dosis-dependiente, la recuperación funcional de lesiones nigro-estriatales inducidas por 6-OHDA e inhibe la degeneración neuronal inducida por isquemia hipóxica en diversas regiones de cerebro de rata. Estos estudios tomaron como base los resultados previos de Gudasheva *et al.*, que identifican la presencia endógena de cPG en cerebro de ratas¹⁶, y que describen su importante actividad nootrópica y ansiolítica^{16, 17, 18}. Este último grupo sugiere que cPG podría ser un ligando endógeno de unos hipotéticos receptores nootrópicos de los que el piracetam (2-oxo-1-pirrolidinacetamida, **3**), como prototipo de potenciador cognitivo, sería un ligando exógeno¹⁶. Asimismo, Gudasheva *et al.* sugieren que los derivados de N-acilprolilglicina nootrópicos pueden ser considerados profármacos de cPG, hipótesis que, mediante estudios de metabolismo, corroboran en el caso del éster etílico de la N-fenilacetilprolilglicina (GVS-111, Noopept, **4**), uno de los más potentes^{19,20}. El GVS-111 posee propiedades neuroprotectoras superiores a las del piracetam y se encuentra en experimentación fase clínica II por su importante actividad

neuroprotectora y potenciadora de la memoria^{21, 22, 23, 24}. La mejoría en las facultades cognitivas por piracetam se puso de manifiesto en 1967, estimulando el diseño y síntesis de un gran número de moléculas estructuralmente relacionadas, la gran mayoría portadoras del anillo de 2-oxopirrolidina, que mostraron un perfil farmacológico similar, y, a las que se conoce con la denominación general de nootropos²⁵. En general, los nootropos tipo piracetam no poseen afinidad por los receptores centrales más importantes, aunque se ha descrito que modulan la mayoría de los neurotransmisores centrales, particularmente acetilcolina y glutamato. Los miembros de este tipo comparten el revertir la amnesia producida por escopolamina, shock electroconvulsivo e hipoxia, pero, a pesar de la similitud en sus estructuras y en sus efectos farmacológicos, el mecanismo común de acción a nivel molecular de estos fármacos neuroprotectores y potenciadores cognitivos sigue siendo desconocido. Este hecho ha dificultado su aceptación, si bien su efectividad clínica y escasísima toxicidad, ha conducido a la comercialización de varios de ellos, además del propio piracetam, para el tratamiento de patologías neurodegenerativas relacionadas con la edad, tales como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson en estados leves a moderados²⁶.

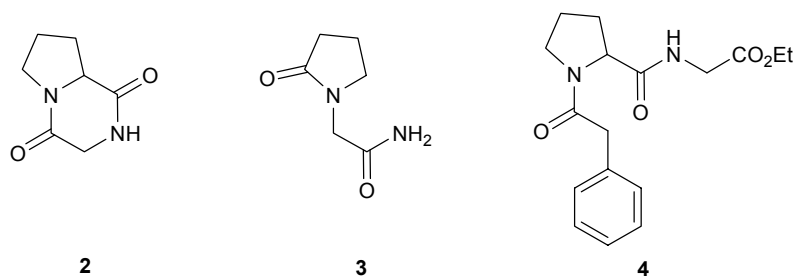


Figura 1.2. cPG (2), Piracetam (3) y Noopept (4).

En resumen, aunque contradictorios, existen antecedentes bibliográficos que afirman que el tripéptido GPE es un profármaco del dipéptido cíclico endógeno cPG. Por otra parte, se ha demostrado que cPG es el metabolito del derivado dipeptídico de prolilglicina Noopept, relacionado con el bien conocido fármaco piracetam del que se ha sugerido que es un mimético de cPG al fijarse supuestamente ambos a un hipotético receptor nootrópico. Todos estos antecedentes nos hacen pensar en una posible interrelación entre los cuatro compuestos, 1, 2, 3 y 4, en los que, además de haberse

descrito varios efectos farmacológicos centrales similares, se puede observar un marcado parecido estructural. Asimismo, denominador común de los cuatro es el no haberse aclarado, hasta el momento, el mecanismo de acción a nivel molecular para ninguno de ellos.

Un inconveniente con que cuenta GPE para su estudio y administración terapéutica es su desfavorable perfil farmacocinético derivado de su propia naturaleza peptídica ya que, como se ha indicado anteriormente, tiene una vida media muy corta. Por ello, parece razonable la búsqueda de miméticos no peptídicos de este tripéptido metabólicamente estables, y ,en general, con mejores propiedades farmacocinéticas que, a la vez de ser mejores candidatos a fármacos, puedan utilizarse como herramientas para ayudar a clarificar su mecanismo de acción y su potencial relación con otros compuestos con efecto neuroprotector.

1.2. POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LOS PÉPTIDOS. PEPTIDOMIMÉTICOS

Los esfuerzos desarrollados en los últimos treinta años en la búsqueda de ligandos no peptídicos que se fijen a receptores de péptidos endógenos queda reflejado en el elevado número de trabajos, publicados durante este tiempo, en los que el término de “*peptidomimético*” aparece como palabra clave. Esto es debido, en gran medida, al descubrimiento, que ha tenido lugar durante estos años, de una amplia variedad de péptidos endógenos que juegan papeles biológicos muy importantes, tales como hormonas, inhibidores y sustratos enzimáticos, neurotransmisores e inmunomoduladores, entre otros²⁷. Estos péptidos, tras fijarse a sus correspondientes receptores o enzimas, pueden influir en la comunicación intercelular y controlar una serie de funciones vitales tales como el metabolismo, defensa inmune, digestión, respiración, sensibilidad al dolor, reproducción, comportamiento y niveles electrolíticos. Este amplio rango de actividades justifica el reconocido potencial terapéutico de los péptidos y, de hecho, la utilización de algunos de ellos como fármacos, como es el caso clásico de la insulina y del primer inhibidor de la fusión del VIH-1, enfuvirtide, recientemente comercializado en Estados Unidos^{27, 28}. Investigaciones de mercado apuntan hacia un aumento en el uso de fármacos peptídicos, debido a los avances en los sistemas de fabricación y administración. No obstante, los elevados costes de I+D, el difícil escalado y las limitaciones en la administración clínica, inherentes a la propia estructura peptídica, hace que su

comercialización sólo tenga lugar cuando se trata de fármacos singulares frente a los que prácticamente no existe otra opción terapéutica²⁹. Entre las limitaciones de los péptidos para su aplicación terapéutica se encuentran su rápida degradación por peptidasas, específicas o no específicas, en condiciones fisiológicas y su escasa biodisponibilidad oral por lo que la vía de administración usual es la inyección, como ocurre en el caso de GPE. Otras limitaciones frecuentes son la rápida eliminación, dificultades para atravesar la barrera hematoencefálica cuando se requiere un efecto sobre el sistema nervioso central y la alta flexibilidad conformacional en disolución, que conlleva la capacidad de unión a diversos receptores y, por lo tanto, una baja especificidad de acción con posibles efectos secundarios adversos³⁰. Parte de estas limitaciones se representan en la Figura 1.3.

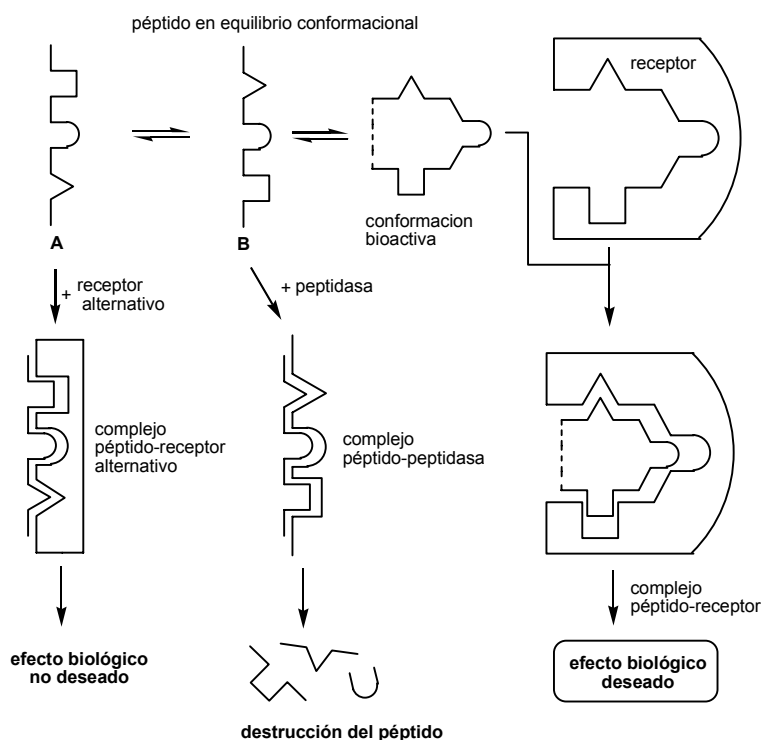


Figura 1.3. Algunos inconvenientes de las estructuras peptídicas para su utilización terapéutica.

Para intentar subsanar los inconvenientes, arriba indicados, que presenta la utilización terapéutica de los péptidos, aprovechando a la vez, su alto potencial para el desarrollo de nuevos fármacos, se acuña el concepto de “*peptidomiméticos*” en alusión a

aquellos compuestos que no poseen elementos estructurales peptídicos, pero sí son capaces de fijarse a receptores peptídicos, mimetizando o antagonizando el efecto biológico del correspondiente péptido natural^{31, 32}. Aunque el término *peptidomimético* se utilice a veces para definir estructuras parcialmente peptídicas, un peptidomimético, propiamente dicho, ya no tiene las clásicas características peptídicas tales como enlaces peptídicos enzimáticamente escindibles³¹.

La búsqueda de peptidomiméticos se aborda, esencialmente, mediante dos aproximaciones, que pueden ser complementarias^{30b, 33c}:

a) Cribado de compuestos, tanto de origen natural como procedentes de colecciones sintéticas, frente a receptores peptidérgicos con el fin de encontrar compuestos con una afinidad significativa, aunque generalmente moderada. Una vez seleccionado así el primer prototipo se le aplican los principios de variaciones estructurales, más o menos clásicos, de la Química Médica hasta lograr el candidato terapéutico apropiado³³. Consecuencia de la implantación de la química combinatoria en sus distintas modalidades y de los cribados de alta eficacia, esta aproximación ha alcanzado una amplia aceptación en compañías farmacéuticas por ser capaz de proporcionar con rapidez unos primeros cabezas de serie, si bien la mayoría de los ligandos descubiertos hasta el momento son antagonistas.

b) Estrategia basada en la estructura del péptido nativo consistente en el establecimiento sistemático de relaciones estructura/conformación/actividad. Implica la conjunción de síntesis química, ensayos biológicos y estudios conformacionales, particularmente, estos últimos, mediante análisis por RMN y modelización molecular^{33c, 34}.

Aunque se hayan realizado avances en la caracterización de receptores, se siguen encontrando dificultades para determinar la estructura tridimensional del complejo péptido-receptor, y, por tanto, para un diseño de peptidomiméticos basado en esta estructura. En el caso del tripéptido GPE, no sólo se desconoce la estructura del citado complejo, sino que tampoco está claro a través de qué (sub)receptor(es) se fija para provocar su efecto neuroprotector o si, incluso, existe un receptor específico desconocido del que GPE sería el ligando natural endógeno⁶. Por ello, hemos emprendido la búsqueda de miméticos de este tripéptido utilizando su propia estructura como modelo de partida.

El diseño de peptidomiméticos a partir de la estructura del péptido nativo implica cubrir una serie de etapas, indicadas en la Figura 1.4, en las que se van definiendo paulatinamente los requisitos estructurales que proporcionan al péptido su actividad. A lo largo de estas etapas el péptido va perdiendo sus características peptídicas hasta poder acceder finalmente a una estructura totalmente no peptídica -peptidomimético- capaz de fijarse al correspondiente receptor del péptido en cuestión con una afinidad significativa. Como se indica en la figura, en primer lugar, se determina el fragmento mínimo activo para lo que se sintetizan y evalúan fragmentos truncados, tanto continuos como discontinuos. A continuación, se sustituyen sistemáticamente los aminoácidos que integran la secuencia mínima por alanina y aminoácidos de la serie D, para explorar la importancia del tipo, funcionalidad y orientación de las cadenas laterales del fragmento mínimo. En este sentido, es también útil modificar las propiedades estéricas, hidrófobas o hidrófilas y ácidas o básicas de las cadenas laterales clave para obtener mayor información sobre los requisitos del bolsillo de unión del receptor y sus características tridimensionales^{34f}.

Posteriormente, se llevan a cabo modificaciones en el esqueleto peptídico, mediante la sustitución de alguno de los enlaces peptídicos, CONH, por agrupamientos bioisósteros, fundamentalmente en aquellos enlaces más susceptibles del ataque por peptidasas, para conducir a los correspondientes pseudopéptidos $\Psi[]^*$ con una mayor estabilidad metabólica³⁵. Entre los sustitutos del enlace peptídico más utilizados se encuentran, entre otros, los grupos CH_2NH , CHOHCH_2 , COCH_2 y NHCO ^{30b, 33c, 35}. En esta etapa hay que señalar que, aunque en general sólo se encuentra la forma *trans*, como conformero más estable, alrededor del enlace peptídico amida, no deben ignorarse los conformeros *cis* como posibles candidatos de la conformación bioactiva, especialmente en el caso de enlaces $\text{AA}_n\text{-Pro}$ en los que existe una población *cis* significativa³⁶. A este respecto, el anillo de 1,2,3,4-tetrazol 1,5-disustituido y el grupo (*E*)- CH=CH- son los más utilizados como sustitutos del enlace peptídico en disposición fija *cis*³⁷.

* Se define como pseudopéptido a aquel péptido en el que alguno de sus enlaces amida peptídicos ha sido sustituido por otros grupos. El enlace peptídico modificado se indica introduciendo entre los símbolos de los aminoácidos unidos por dicho enlace, la letra griega Ψ seguida, entre corchetes, del agrupamiento que sustituye al enlace peptídico.

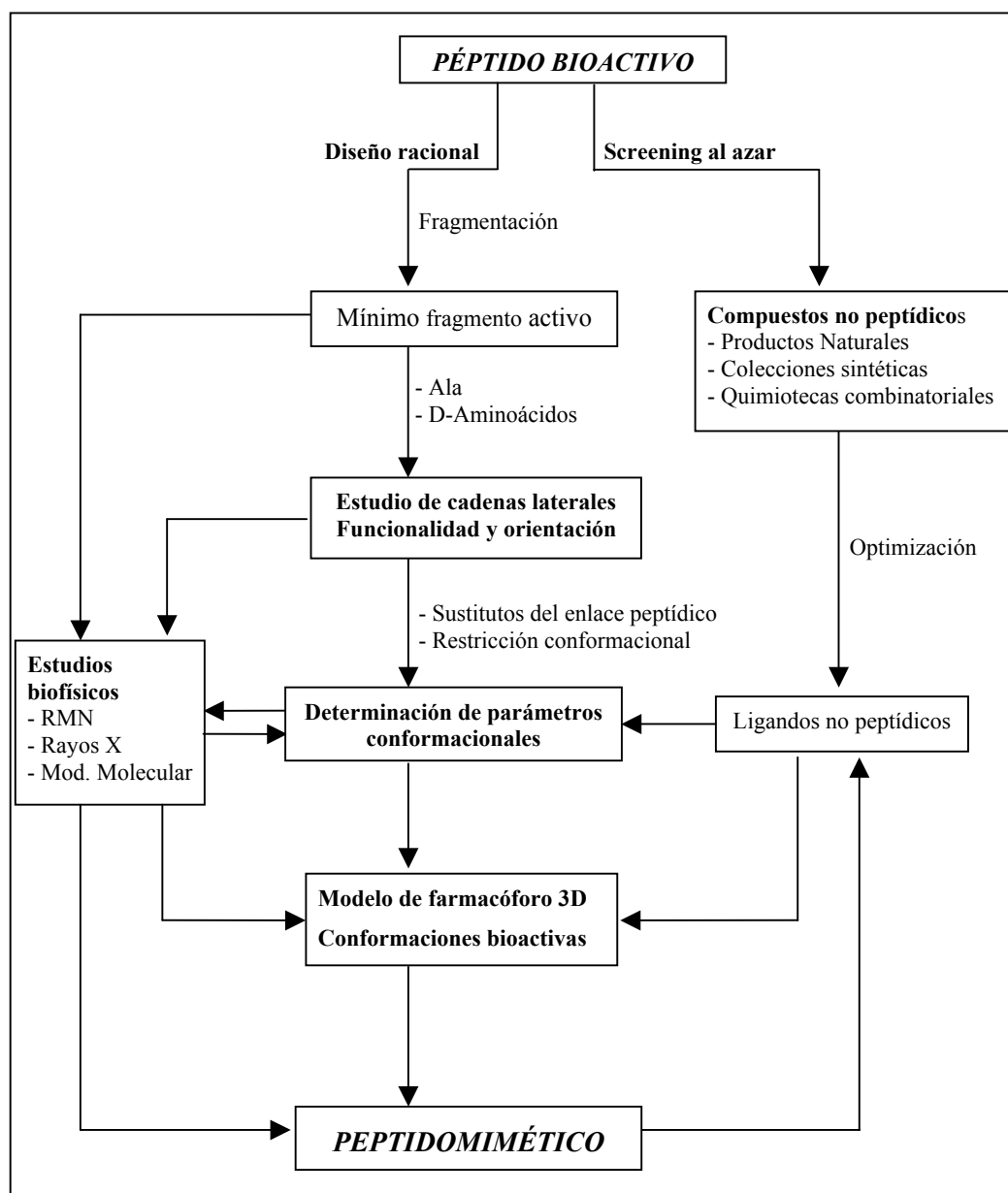


Figura 1.4. Estrategia para el diseño de agonistas y antagonistas no peptídicos de receptores peptidérgicos.

En la sustitución de enlaces peptídicos hay que tener en cuenta los cambios consiguientes derivados de las diferencias estereoelectrónicas entre el grupo amida y el respectivo grupo utilizado como sustituto así como que el cambio también afecta a los aspectos conformacionales. Respecto a estos aspectos, la determinación de la

conformación bioactiva es un paso clave para el diseño de peptidomiméticos a la vez de un reto teniendo en cuenta la inherente flexibilidad conformacional de los péptidos pequeños. El adquirir conocimiento acerca de la conformación bioactiva de un ligando peptídico supone la incorporación en su estructura de diferentes restricciones conformacionales dirigidas a obtener una diversidad estereoquímica³⁴.

Las restricciones conformacionales se pueden clasificar, en general, en tres grupos, atendiendo al grado de rigidez que confieren al péptido: (a) restricciones locales, (b) restricciones regionales, y (c) restricciones globales. Estas últimas implican ciclaciones *N*-*C*-terminales, ciclaciones cadena lateral-*N*- o -*C*-terminal o ciclaciones a través de cadenas laterales.

La vía principal para la incorporación de restricciones conformacionales locales, además de la incorporación de sustitutos del enlace peptídico adecuados (dobles enlaces *trans*, *N*-alquil derivados), es la inserción en el péptido de derivados de aminoácidos en los que se fija uno o más de sus ángulos diedros (Figura 1.5, ϕ , ψ , χ), mediante alquilaciones o ciclaciones. Así, la introducción de grupos alquilo en posición α ³⁸ o β ³⁹ afecta a todos los ángulos diedros del residuo modificado, mientras que las ciclaciones N_α - C_α fijan el ángulo ϕ , siendo el valor de este ángulo dependiente del tamaño del ciclo. La mayor parte de los aminoácidos N_α - C_α cíclicos, utilizados para la restricción conformacional en péptidos, son derivados de prolina y ácidos pipercolícos, aunque también se han utilizado homólogos inferiores (azetidinas y aziridinas) y superiores (azepanos y azocanos)⁴⁰. Las ciclaciones entre el N_α y algún átomo de la cadena lateral constituyen una vía para la restricción simultánea de los ángulos ϕ y χ del aminoácido. Dentro de este apartado destacan los derivados de prolina sustituidos en posición 3 (ciclación N_α - C_β)⁴¹ y los derivados de isoquinolinas y tetrahydro- β -carbolinas, obtenidos a partir de aminoácidos aromáticos (ciclación N_α - C_ω)⁴².

La introducción de restricciones regionales implica esencialmente la incorporación en el péptido de análogos de aminoácidos y dipéptidos, capaces de inducir o mimetizar elementos de la estructura secundaria peptídica, fundamentalmente, de giros inversos. Aunque recientemente se ha demostrado que existen péptidos muy pequeños, incluso tripéptidos, que, en disolución, adoptan conformaciones preferentes⁴³, en general,

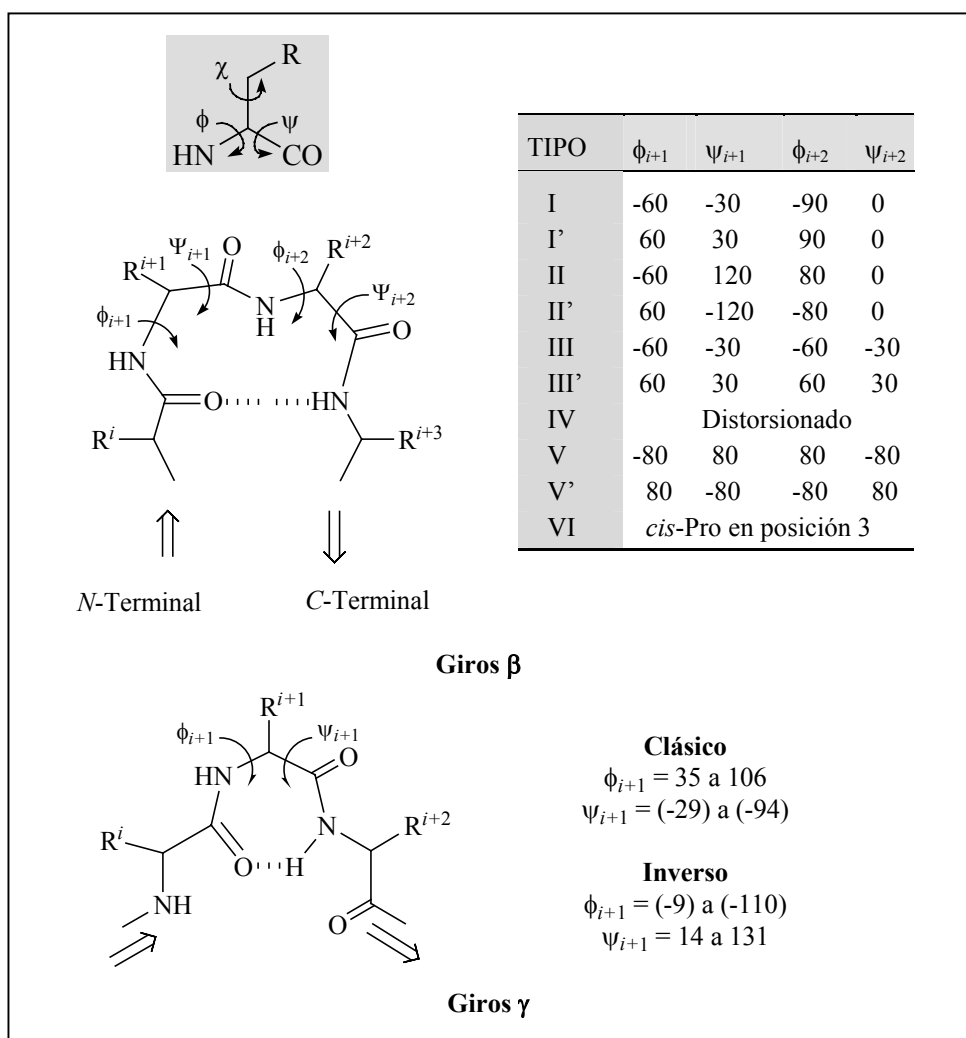


Figura 1.5. Giros inversos de péptidos y proteínas.

los péptidos pequeños (<20 aminoácidos), conformacionalmente flexibles, se encuentran, en un equilibrio conformacional entre múltiples conformaciones. Sin embargo, cuando el péptido se fija a un receptor entra a formar parte integral de la estructura de éste, por lo cual se puede pensar que el péptido adopta, como conformación bioactiva, la estructura secundaria del receptor en la región de unión entre ambos. De hecho, estudios de relaciones estructura-actividad de pequeños péptidos indican, a menudo, la presencia de giros en su conformación bioactiva. Los giros inversos en péptidos y proteínas se definen, de forma general, como las partes de su estructura en las que hay un cambio en la

dirección de la cadena peptídica, siendo los más abundantes y más conocidos los β y los γ ⁴⁴ (Figura 1.5).

Estructuralmente los giros β pueden definirse como pseudociclos de diez eslabones, formados por cuatro residuos de aminoácidos, generalmente estabilizados por un enlace de hidrógeno intramolecular entre el C=O del residuo i y el NH del residuo $i+3$. El tipo específico de giro β se clasifica en función de los valores de los ángulos diedros ϕ y ψ de los dos residuos centrales (Figura 1.5, residuos $i+1$ e $i+2$). Por su parte, los giros γ forman un pseudociclo de siete miembros, constituidos por tres residuos de aminoácidos, generalmente estabilizados por un enlace de hidrógeno intramolecular entre el C=O del residuo i y el NH del residuo $i+2$, clasificándose en clásicos e inversos de acuerdo con los valores de los ángulos diedros ϕ y ψ para el residuo $i+1$ ⁴⁵.

Desde los trabajos pioneros de Freidenger⁴⁶ a principios de los 80 en los que se propone la utilización de ciertas lactamas para inducir giros β , han sido muchos los trabajos en que se describen numerosas estructuras miméticas de estos giros, mayoritariamente lactamas mono-y bicíclicas⁴⁷. A pesar de ello, pocas han demostrado su capacidad para mimetizar o antagonizar la actividad biológica de un péptido una vez incorporadas a éste debido a la dificultad en predecir y reproducir la disposición de las cadenas laterales en la conformación bioactiva del péptido.

En lo que respecta a los miméticos de giros γ , el número de estructuras propuestas como tales es mucho más escaso, limitándose a 2-oxo-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepinas^{48a,b}, 5,7-dioxo-hexahidro-1,4-diazepinas^{48c}, 2-oxopiperidinas^{48d} morfolin-3-onas^{48e}, y a los derivados de 2-oxopiperazina, recientemente descritos por nuestro grupo^{48f}.

Una vez cumplimentadas las etapas, hasta aquí comentadas, los resultados de los estudios de relaciones estructura/conformación/actividad pueden permitir deducir una hipótesis sobre las características del farmacóforo y de la conformación bioactiva del péptido lo que, como se ha indicado en la Figura 1.4, pone en disposición de abordar el diseño final de peptidomiméticos. En esta última etapa se utilizan estructuras no peptídicas, generalmente cíclicas, sobre las cuales se anclan los elementos estructurales esenciales para el reconocimiento péptido-receptor, en la disposición espacial apropiada.

En resumen, el diseño de peptidomiméticos basado en la estructura del péptido activo consiste en ir alcanzando la serie de objetivos parciales que se representan de manera gráfica en la Figura 1.6^{33c}. Tras conseguir un primer ligando no peptídico del correspondiente receptor peptídico, como prototipo, provisto de la funcionalidad requerida, agonista o antagonista, el reto siguiente es la optimización de sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas a través de las modificaciones clásicas de la química médica en conjunción con metodologías sintéticas de química combinatoria.

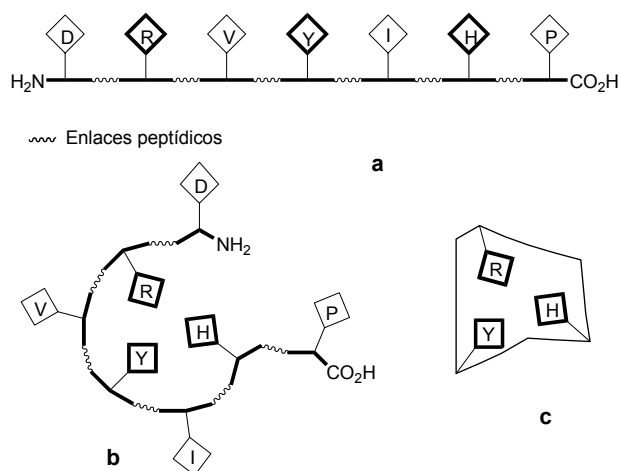


Figura 1.6. Objetivos clave para el diseño de peptidomiméticos: a) Identificación de los aminoácidos imprescindibles para la actividad agonista del fragmento mínimo. b) Determinación de la conformación bioactiva. c) Peptidomimético.

En la selección de esqueletos cíclicos no peptídicos capaces de orientar a los correspondientes grupos farmacóforos en la adecuada disposición tridimensional, la utilización de estructuras privilegiadas o, lo que es lo mismo, subestructuras recurrentes en la estructura de moléculas con diversos efectos biológicos, se ha revelado de gran utilidad tanto en el campo de peptidomiméticos⁴⁹ como, en general, en la química médica⁵⁰. El concepto de *estructura privilegiada* fue introducido por Evans *et al.*⁵¹ en 1988 en el contexto de un trabajo referente a una serie de antagonistas de colecistoquinina derivados de benzodiazepina, heterociclo también presente en ansiolíticos, anticonvulsivos, antihipnóticos, antagonistas de la transcriptasa inversa del VIH y en muchos otros compuestos farmacológicamente activos. A partir de dicho trabajo, el

término de “privilegiado” en el campo de diseño de fármacos, califica a aquellas subestructuras o esqueletos, generalmente heterocíclicos rígidos o semirrígidos, capaces de proporcionar ligandos con alta afinidad para diferentes receptores mediante la conveniente modificación de los sustituyentes. Adicionalmente, estos esqueletos suelen mostrar unas propiedades farmacocinéticas adecuadas para su aplicación como fármacos. Además del esqueleto de benzodiazepina, los anillos de indol, piperidina y piperazina ocupan, entre otros, un destacado lugar como estructuras privilegiadas, como indicaremos a continuación para éste último heterociclo.

1.3. PIPERAZINAS Y OXOPIPERAZINAS COMO ESTRUCTURAS PRIVILEGIADAS

El ciclo de piperazina es un claro exponente de esqueleto o molde privilegiado, dada su alta incidencia en diversas estructuras implicadas en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos, bien formando parte del farmacóforo o bien como grupo sustituyente de éste^{49, 50, 52}. Prueba de ello es que en 2001, solamente las fenilpiperazinas que se encontraban en el mercado farmacéutico eran ya dieciséis y veintitrés en fase clínica II o III, cubriendo un total de dieciocho indicaciones terapéuticas⁵².

Dentro de los derivados de piperazinas, las 2-oxopiperazinas y las 2,5-dioxopiperazinas han representado el principal foco de atención tanto por su presencia en un amplio abanico de compuestos bioactivos como por su utilidad para la incorporación de restricciones conformacionales en péptidos, incluyendo la posibilidad de mimetizar giros inversos. Así, estructuras de 2-oxopiperazinas se encuentran presentes en análogos de Leu-enkefalina, antagonistas de receptores de colecistoquinina (CCK), análogos de sustancia P, antagonistas de glicoproteína IIb/IIIa, inhibidores de glicosidasa, inhibidores de farnesil transferasa e inhibidores duales de farnesil transferasa/geranil transferasa⁵³.

Por su parte las 2,5-dioxopiperazinas se encuentran formando parte del esqueleto de numerosos compuestos naturales biológicamente activos de complejidad estructural y actividad biológica diversas, que abarca desde alcaloides indólicos bicíclicos o

policíclicos hasta estructuras sencillas cuyos representantes más simples son los dipéptidos cíclicos que, a su vez, constituyen los derivados peptídicos naturales más sencillos^{54, 55}. Además, diversos compuestos sintéticos portadores del anillo de 2,5-dioxopiperazina han mostrado interés en química médica como antagonistas de bradiquinina y de opioides, antagonistas duales 5HT_{1a}/D₂ y agonistas 5HT_{1a}, y moduladores del receptor de dopamina D₂ entre otros campos farmacológicos⁵⁶. Otros, incluso, se han utilizado en medicina como antibióticos, vacunas sintéticas y en la quimioterapia de diversos tipos de cáncer⁵⁷.

Aunque la mayoría de los dipéptidos cíclicos se han aislado como metabolitos de microorganismos, ciclo(Pro-AA_n) (AA_n=Leu, Val, Phe, Tyr, Trp), ciclo(Ala-Leu), ciclo(His-Pro) y ciclo(Gly-Pro) están presentes en el reino animal y vegetal^{55a}, concretamente, ciclo(His-Pro) (cHP, **5**, Figura 1.7) y ciclo(Gly-Pro) (cGP, **2**) se encuentran en mamíferos, mostrando ambos interesantes actividades fisiológicas y/o farmacológicas, como se ha comentado para este último, objeto de nuestra atención, en el Apartado 1.1. Por su parte, cHP es un metabolito de la hormona liberadora de tirotropina (TRH, Glp-His-Pro-NH₂) para el que, como en el caso del tripéptido hormonal, se han descrito efectos neuroprotectores. Modificación de cHP mediante sustitución del residuo de His por el de otros aminoácidos no naturales, manteniendo el residuo de Pro, ha conducido a derivados de 2,5-dioxopiperazinas, concretamente a hexahidropirrol[1,2-*a*]pirazina-1,4-diona-3-sustituidas con acción neuroprotectora muy potente en diversos modelos farmacológicos y para los que se ha sugerido un efecto nootrópico, como es el caso del derivado **6**⁵⁸.

A la vista de la impresionante cantidad de estructuras con actividad biológica o/y con aplicación química médica de las que forma parte el esqueleto de 2,5-dioxopiperazina, tanto de origen natural como sintético, se puede observar la elevada incidencia de aquellas derivadas de prolina o, lo que es lo mismo, de la estructura bicíclica de 1,4-dioxoperhidropirrol[1,2-*a*]pirazina⁵⁹. Así, además de los dipéptidos cíclicos neuroprotectores **2**, **5** y **6** y análogos, antes indicados, citaremos a modo de ejemplo como portadores de dicha estructura los alcaloides naturales antitumorales tripostatina B (**7**)⁶⁰ y desmetoxifumitremorgina C (**8**)⁶¹, así como los derivados sintéticos

9^{56d} y **10**^{56e}, agonista 5HT_{1a}, selectivo frente a receptores α_1 y modulador del receptor de dopamina D₂, respectivamente (Figura 1.7).

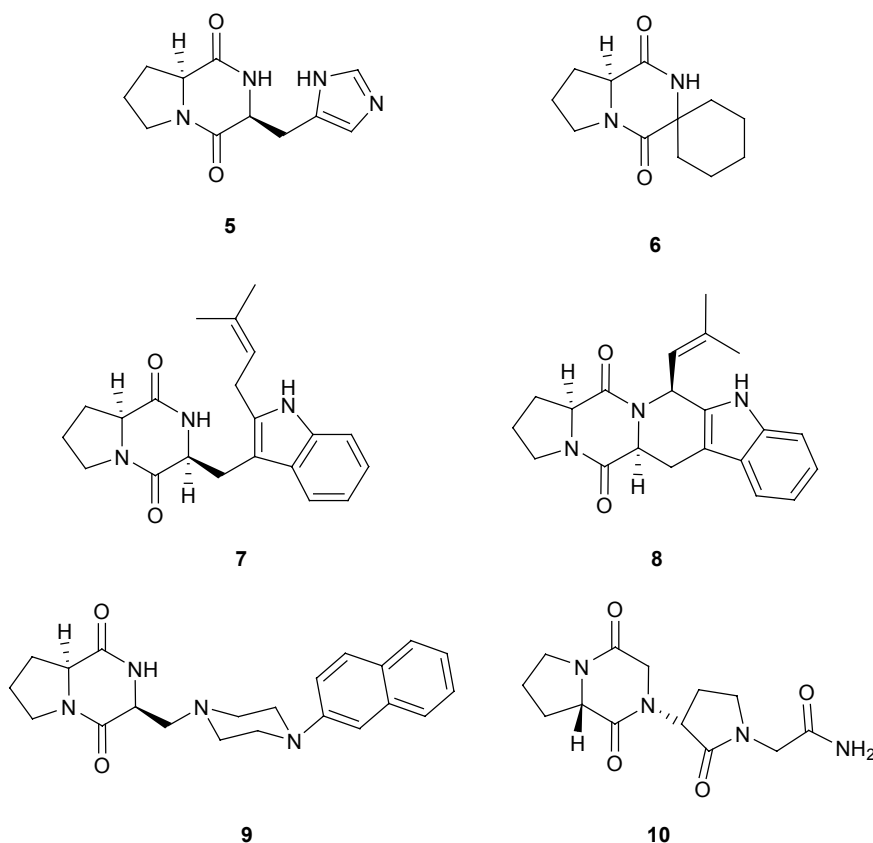


Figura 1.7. Ejemplos representativos de derivados de perhidropirroló[1,2-*a*]pirazina-1,4-diona farmacológicamente activos.

Sin embargo, a diferencia de la utilización del esqueleto de 1,4-dioxoperhidropirroló[1,2-*a*]pirazina en compuestos de interés en química médica, heterociclos bicíclicos estructuralmente relacionados, tales como análogos en los que los grupos carbonílicos ocupan distinta posición, derivados oxo- o trioxo-sustituídos o, en general, piperazinas bicíclicas análogas, han sido infrautilizados hasta el momento. Dentro de los escasos ejemplos, citaremos los derivados de perhidropirroló[1,2-*a*]pirazina **11**⁶², recientemente descritos como antagonistas selectivos de receptores de melanocortina, los monooxoderivados **12**, antagonistas de endotelina⁶³ y el potente

nootrópico unifiram (**13**), perteneciente a la familia del anteriormente comentado piracetam, en el que el anillo de piperazina está condensado con el de oxopirrolidina, éste último rasgo característico de la mayoría de los nootrópicos de esta familia^{25b, 64} (Figura 1.8).

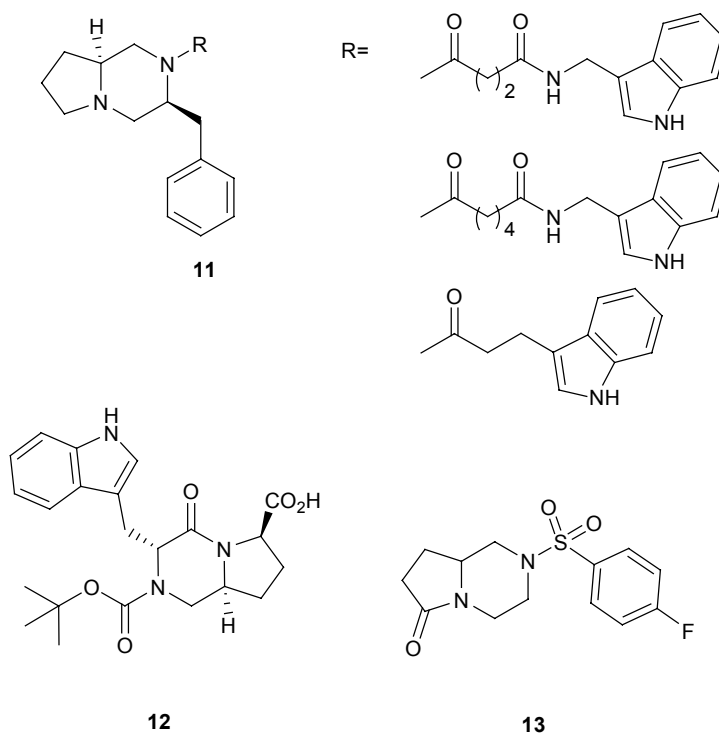


Figura 1.8. Ejemplos representativos de derivados de perhidropirrolo[1,2-*a*]pirazinas farmacológicamente activos.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Como se ha indicado en el capítulo anterior, estudios farmacológicos experimentales y clínicos previos han demostrado que el tripéptido GPE, fragmento *N*-terminal resultante del metabolismo del IGF-1, posee importantes efectos neuroprotectores, aunque se degrada rápidamente por peptidasas. Por otra parte, se ha descrito que el dipéptido endógeno cíclico cPG posee actividad nootrópica y neuroprotectora, habiendo sido propuesto, por parte de algunos autores, que este dipéptido cíclico es, junto con el ácido glutámico, el último metabolito del GPE y el responsable de la actividad neuroprotectora del tripéptido. Tanto en el caso de GPE como de cPG sus respectivos mecanismos de acción están lejos de estar claros. En base a estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es la obtención de miméticos de GPE metabólicamente estables así como de análogos de cPG que pudieran servir para explorar una nueva estrategia en la búsqueda de nuevos agentes neuroprotectores y, a su vez, para ser utilizados como herramientas farmacológicas para esclarecer el mecanismo de acción de GPE. Para abordar las dos directrices complementarias de este objetivo se ha propuesto el siguiente plan de trabajo:

1. Aproximación racional hacia la obtención de miméticos no peptídicos de GPE, basada en la estructura de este tripéptido. El plan, además de incluir un detallado análisis conformacional de GPE, contempla la síntesis y evaluación farmacológica de análogos peptídicos y pseudopeptídicos de GPE así como

de oxopiperazinas y derivados bicíclicos portadores de residuos de glicina y glutámico.

2. Síntesis y evaluación farmacológica de oxopiperazinas bicíclicas análogas de cPG.
3. Estudio, en cada caso, de relaciones estructura-actividad y, finalmente, análisis conjunto de los resultados biológicos de ambas series.

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE GPE

3.1.1. RASGOS CONFORMACIONALES

De acuerdo con el primer punto del plan de trabajo, encaminado hacia el diseño de miméticos no peptídicos de GPE, se ha llevado a cabo un estudio detallado de este tripéptido con el fin de conocer su comportamiento conformacional en disolución. Aunque tradicionalmente ha sido aceptado que los péptidos cortos son totalmente flexibles, una gran cantidad de estudios conformacionales, apoyados por experimentos de actividad biológica, señalan que la actividad de los péptidos no solo se debe a la presencia de grupos funcionales apropiados para unirse al receptor, sino que depende de forma dramática de la conformación global del péptido en cuestión. En el caso de péptidos pequeños lineales, como es el caso del tripéptido GPE (Gly-Pro-Glu), se observa generalmente la presencia de un gran número de confórmeros en disolución, difícilmente identificables mediante métodos analíticos o espectroscópicos. Sin embargo, como ya se ha indicado en la Introducción, se han descrito recientemente una serie de estudios conformacionales de tripéptidos⁴³ y tetrapéptidos⁶⁵, que demuestran que dichos péptidos son capaces de adoptar una conformación preferente en disolución. Estas conformaciones están estabilizadas por enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas entre los grupos terminales, de tal manera que queda restringida su flexibilidad conformacional.

La conformación global de un péptido depende de la disposición espacial que adopta la cadena peptídica y está definida por los ángulos ϕ y ψ de cada residuo⁶⁶. Además, la cadena puede sufrir giros y plegamientos como consecuencia de las posibles rotaciones de los distintos fragmentos y de la formación de enlaces de hidrógeno que son enlaces débiles, muy direccionales, de naturaleza básicamente electrostática y de una intensidad moderada (menos de 10 Kcal/mol). Su existencia es clave en todos los fenómenos de reconocimiento molecular y en los de formación de estructura secundaria^{44,67}. Por otra parte, en el caso del tripéptido que nos ocupa, debemos tener muy en cuenta la presencia de la prolina por ser un aminoácido singular debido a su naturaleza de amina secundaria incorporada a un anillo saturado, lo que le confiere propiedades conformacionales únicas comparado con el resto de aminoácidos proteinogénicos⁶⁸. Estas dos peculiaridades son el comportamiento conformacional del anillo de pirrolidina y la rotamería *cis/trans* en torno al enlace peptídico con el aminoácido precedente.

Por todo ello, para abordar el estudio conformacional del tripéptido GPE, se ha prestado especial atención a los siguientes rasgos conformacionales:

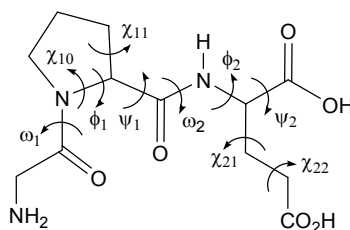


Figura 3.1. Ángulos de torsión que definen GPE.

1. El equilibrio conformacional del anillo de pirrolidina del residuo de Pro.
2. La isomería *cis/trans* en torno al enlace Gly-Pro.
3. Los ángulos ϕ y ψ de cada residuo.
4. Las posibles conformaciones que puede adoptar la cadena lateral del residuo de glutámico.

Tal como se muestra en la Figura 3.1, estas características conformacionales quedan definidas por los ángulos de torsión endocíclicos χ_{10} y χ_{11} para el equilibrio conformacional del anillo de pirrolidina del residuo de prolina, el ángulo de torsión ω_1

para la rotamería *cis/trans* del enlace Gly-Pro, los ángulos ϕ_1 , ψ_1 y ϕ_2 para la conformación del esqueleto peptídico, el ángulo ω_2 del enlace Pro-Glu y los ángulos de torsión χ_{21} y χ_{22} para las posibles conformaciones que puede adoptar el residuo de glutámico.

Desde el punto de vista geométrico, el anillo de pirrolidina de la prolina no es plano, sino que adopta conformaciones fuera del mismo. Básicamente, existen dos tipos de conformaciones del anillo de cinco miembros: tipo *sobre* (E) y tipo *twist* (T), siendo generalmente las formas *sobre* (E) más estables que las formas *twist* (T). La conformación del anillo de pirrolidina es compleja, ya que las rotaciones respecto a los distintos enlaces se producen de una forma concertada, y no de modo independiente como podía ser el caso de una cadena lineal⁶⁹. La descripción matemática de la conformación de los anillos de cinco miembros se denomina *pseudorotación*⁷⁰. Según este modelo, podemos definir la conformación de un anillo de cinco miembros a partir de dos parámetros, el ángulo de fase (P) y el de amplitud máxima

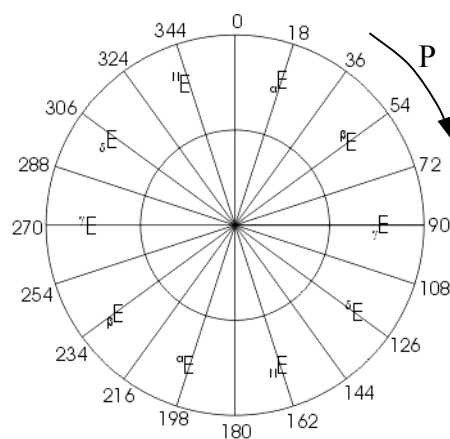


Figura 3.2. Circuito pseudorotacional para L-Prolina.

de plegamiento (v_{\max}). El parámetro P nos da información sobre que átomo o átomos están fuera del plano formado por el resto. El parámetro v_{\max} indica en que medida están fuera del plano dichos átomos. Como se puede observar en la Figura 3.2[†], todas las posibles conformaciones *sobre* (E) o *twist* (T), que puede adoptar el anillo de pirrolidina, se pueden representar en un circuito pseudorotacional, correspondiendo a cada conformación un valor determinado de P.

[†] La nomenclatura utilizada en la Figura que se representa indica en mayúscula la conformación que adopta el anillo de cinco miembros (sólo están representadas formas E) y en superíndice o subíndice el átomo de carbono que queda fuera del plano del anillo formado por los otros cuatro, según se disponga hacia arriba o hacia abajo, respectivamente.

En la mayoría de los estudios conformacionales realizados en prolinas^{68a, 71} no se observa en disolución la existencia de una única conformación, sino de un equilibrio conformacional entre dos confórmeros predominantes: el confórmero γ E ($P=270^\circ$), en donde el C_γ de la prolina está por encima del plano, y el confórmero γ E ($P=90^\circ$), en donde el C_γ de la prolina está por debajo del plano⁶⁹ (Figura 3.3). Como consecuencia de este equilibrio conformacional, la prolina es el único aminoácido natural que presenta un valor restringido de ϕ cercano a -60° , lo que limita la flexibilidad conformacional de la cadena peptídica⁷².

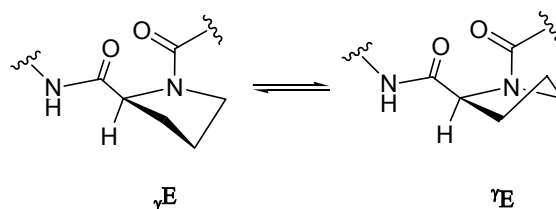


Figura 3.3. Equilibrio conformacional del anillo de pirrolidina en residuos de prolina.

El otro rasgo conformacional característico de los residuos de prolina, es la rotamería *cis/trans* alrededor del enlace peptídico AA_n -Pro. Para la mayoría de los péptidos, este enlace de tipo amida adopta de manera prácticamente exclusiva la disposición *trans*, pero en el caso particular de los residuos de los enlaces AA_n -Pro hay un aumento importante en la población de los isómeros *cis*. La barrera de isomerización de este tipo particular de enlace peptídico es mucho más baja debido a la concomitancia del equilibrio conformacional del anillo de pirrolidina que favorece la existencia de isómeros *cis*^{36, 73} (Figura 3.4). Aunque la barrera energética que controla este equilibrio no es suficientemente elevada para impedir la rotación, si es lo suficientemente alta como para observar en RMN señales correspondientes a los dos confórmeros en condiciones normales de temperatura y disolvente. En general, la rotamería *cis/trans* en torno al

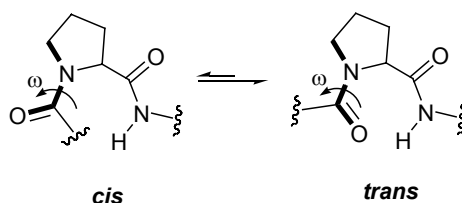


Figura 3.4. Isomería *cis/trans* de la prolina.

enlace AA_n-Pro depende tanto del disolvente⁷⁴, como de la aromaticidad⁷⁵ y la quiralidad⁷⁶ del residuo que precede a la prolina.

3.1.2. METODOLOGÍA UTILIZADA

La estrategia de trabajo utilizada en nuestro estudio conformacional de GPE se ha basado en la obtención y correlación de datos experimentales en disolución obtenidos de los espectros de RMN y de los cálculos teóricos de las estructuras realizados mediante modelización molecular⁷⁷.

3.1.2.1. Simulación por Dinámica Molecular

Con el propósito de analizar el espacio conformacional de GPE, determinar si existe un alto grado de flexibilidad o varias conformaciones preferentes y estudiar los puentes de hidrógeno intramoleculares o intermoleculares que estabilicen determinadas conformaciones, se realizó un estudio de GPE en disolvente acuoso por simulación de Dinámica Molecular (DM). Para ello se consideró que a valores de pH próximos a este disolvente el amino *N*-terminal debe estar protonado ($pK_2 \approx 9.6$)[‡], mientras que tanto el carboxilo *C*-terminal ($pK_1 \approx 2.3$)[§] como el de la cadena lateral del residuo de glutámico ($pK_1 \approx 4.3$)[§] deben estar cargados negativamente.

En un primer paso se eligieron dos geometrías de partida, una correspondiente a una molécula de GPE con disposición *trans* en el enlace peptídico Gly-Pro y una segunda correspondiente a una molécula de GPE con disposición *cis*. A continuación, se procedió a minimizar la energía utilizando el programa Hyperchem 7.52 para Windows⁷⁸. Tanto los cálculos de Mecánica Molecular, utilizando el campo de fuerzas AMBER, como los

[‡] Valor correspondiente al grupo NH₂ de Gly.

[§] Valores correspondientes a los grupos CO_α y CO_γ de Glu, respectivamente.

cálculos semiempíricos por AM1 realizados en vacío, nos condujeron a valores de energía que no eran compatibles con los datos experimentales, ya que el conformero *cis* resultaba ser energéticamente más estable que el *trans*. En consecuencia procedimos a repetir los cálculos teniendo en cuenta el disolvente. Para ello, elegimos un modelo en donde la estructura de partida se colocó en el centro de una caja de disolvente acuoso, con unas dimensiones iguales al triple de la distancia entre los extremos del péptido (19x19x19 Å, 216 moléculas de agua). Los cálculos se realizaron utilizando mecánica molecular con un campo de fuerzas AMBER. En estas condiciones, se obtuvieron estructuras minimizadas con valores de energía compatibles con los datos experimentales, por lo que se eligieron estos tipos de cálculos como los más apropiados para nuestro estudio.

La simulación de Dinámica Molecular se realizó con el programa Hyperchem 7.52 a partir de las dos estructuras minimizadas en el paso anterior. Las estructuras se calentaron a 1000 K, se estabilizaron durante 10 ps y se enfriaron lentamente a 300 K. En cada paso la temperatura se disminuyó de 100 K en 100 K, manteniéndose la nueva temperatura durante 100 ps en cada etapa. Durante este periodo de tiempo los parámetros geométricos del sistema fueron almacenados y optimizados a intervalos regulares sin interrumpir la dinámica. Este proceso dio lugar a un gran número de conformaciones de mínima energía que se compararon entre sí para eliminar, tanto las repetidas, como las que poseían una energía muy superior al mínimo global. Finalmente se obtuvieron alrededor de 80 conformaciones de mínima energía para cada conformero sobre las que se procedió a analizar los resultados. Es de señalar que, en cada caso, la conformación en torno al enlace Gly-Pro se mantiene a lo largo de la simulación, presumiblemente debido a que el tiempo de duración del proceso o la temperatura alcanzada no es suficiente como para superar la barrera energética necesaria para pasar de un conformero a otro.

3.1.2.1 Estudios por RMN

El estudio de GPE por RMN se realizó utilizando muestras disueltas en H₂O/D₂O (90:10, v/v), a una temperatura de 25° C. A pesar de la simplicidad de la estructura de GPE, los espectros de RMN son bastante complejos. Los espectros monodimensionales

de ^1H y ^{13}C -RMN de GPE mostraron duplicidad de sus señales indicando la presencia de, al menos, dos conformaciones preferentes, una mayoritaria y otra minoritaria, que se asignaron a los conformeros *cis* y *trans* en torno al enlace Gly-Pro. Los subespectros correspondientes a cada conformero se asignaron mediante experimentos RMN mono y bidimensionales (gCOSY, gHSQC y gHMBC) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^1H y ^{13}C -RMN de GPE.

	^1H -RMN		^{13}C -RMN	
	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>
Gly				
CO	--	--	167.0	166.6
α	3.76 y 3.55	3.82 y 3.79	41.2	41.4
Pro				
CO	--	--	174.0	174.5
α	4.31	4.29	61.0	61.4
β	2.19 y 1.99	2.09 y 1.82	32.6	30.2
γ	1.77 y 1.68	1.86-1.80	22.9	25.1
δ	3.51-3.23	3.44-3.23	48.4	47.7
Glu				
CO $_{\alpha}$	--	--	178.2	178.2
CO $_{\gamma}$	--	--	179.5	179.4
NH	8.12	8.01	--	--
α	4.07	4.03	55.4	55.1
β	a	1.94 y 1.75	27.3	27.8
γ	2.21	2.23	32.3	31.9

a) No fue posible su asignación debido a encontrarse solapado con el conformero *trans*.

Una vez asignados inequívocamente los espectros, el análisis de los valores de las constantes de acoplamiento vecinales y de los efectos nuclear Overhauser nos permitieron correlacionar éstos con los parámetros geométricos de la cadena peptídica. Las constantes de acoplamiento vecinales, para un determinado fragmento, están relacionadas con los ángulos diedros correspondientes, mientras que la información acerca de la proximidad espacial de los protones de la molécula se puede obtener a partir de diferentes experimentos de RMN bidimensional siendo los de tipo NOESY y ROESY los experimentos más relevantes⁷⁹. Por último, la medida de los coeficientes de temperatura de las señales de los protones amida nos permitió determinar la accesibilidad al disolvente de los protones lábiles de la molécula⁸⁰ y esta información junto a las distancias obtenidas

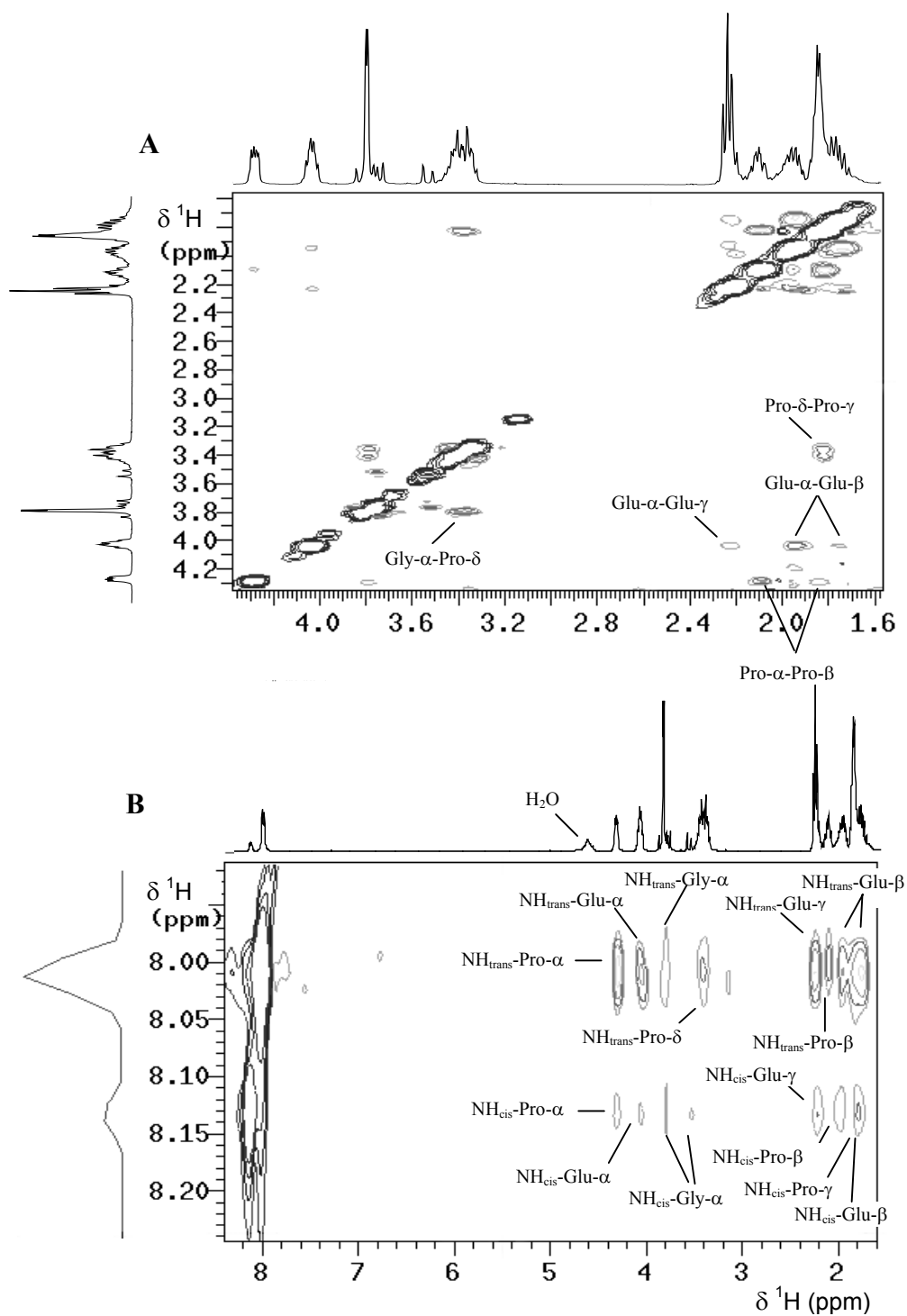


Figura 3.5. Espectro ^1H NOESY de GPE en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ a 500 MHz. (A) Ampliación de la zona a campo alto (sólo se indican las conexiones del rotámero *trans*). (B) Ampliación de la zona de NH.

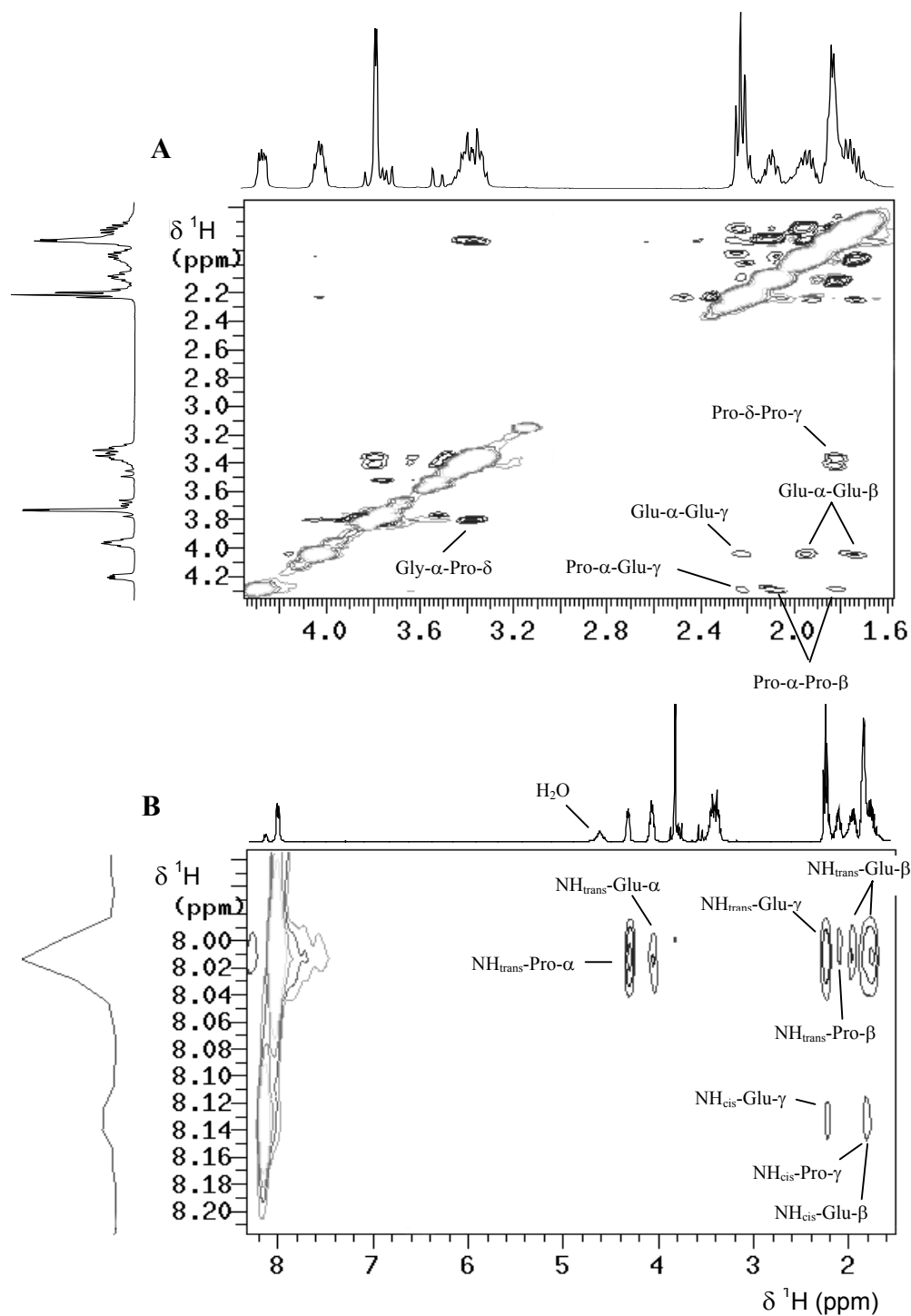


Figura 3.6. Espectro ^1H ROESY de GPE en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ a 500 MHz. (A) Ampliación de la zona a campo alto (sólo se indican las conexiones del rotámero *trans*). (B) Ampliación de la zona de NH.

de los NOEs experimentales, la posible existencia de enlaces de hidrógeno. Como GPE es un péptido corto y por tanto posiblemente flexible, hay que tener en cuenta, al interpretar los datos de RMN, que en disolución deben existir un cierto número de conformaciones en equilibrio y que los datos de RMN corresponden al promedio de las mismas⁶⁷.

El estudio cuidadoso de los espectros NOESY (Figura 3.5) y ROESY (Figura 3.6) de GPE, nos proporcionó un buen número de NOEs observados que nos permitieron identificar qué conformaciones estaban presentes en disolución. Las señales de NOE de los experimentos NOESY y ROESY se clasificaron por su intensidad en tres categorías (fuerte, media o débil). Tanto la comparación de las intensidades de NOEs intraresiduo e interesiduo (los valores observados de NOE entre $H_{\alpha,i}$ - NH_{i+1} en péptidos corresponde, en la mayoría de los casos, a una distancia interprotónica en torno a los 3\AA ^{77a, 81}), como la ausencia de otros característicos (los NOEs no observados sugieren una distancia mínima de 4\AA ⁸²), nos dieron información sobre las distancias internucleares.

Finalmente, la realización de espectros de ^1H -RMN de GPE a 165, 55 y 10 mM no conllevó cambios apreciables ni en la anchura espectral ni en el desplazamiento químico (δ) de sus señales, indicando la ausencia de agregación.

3.1.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Rotamería cis/trans en torno al enlace Gly-Pro

Para el cálculo de las poblaciones de los rotámeros *cis/trans* en torno al enlace Gly-Pro hay que asignar inequívocamente las señales de cada subespectro a su correspondiente confórmero. Para ello, se ha empleado el método propuesto por Siemion et al.⁸³, que utiliza la diferencia de δ de ^{13}C -RMN entre los carbonos C_β y C_γ de la prolina para realizar dicha asignación. De acuerdo con este método, la diferencia de δ entre los carbonos C_β y C_γ de la prolina en la disposición *trans* varía entre 1.3 y 6.0 ppm, mientras

que en la disposición *cis* la diferencia entre ambos carbonos se encuentra en torno a 8.3-10.0 ppm. Así, se ha podido observar que la diferencia de δ entre ambos carbonos para el subespectro más intenso de GPE es de 5.1 ppm, mientras que en el menos intenso esta diferencia es de 9.7 ppm. En consecuencia, el rotámero mayoritario es el *trans*, y el minoritario el rotámero *cis* (Tabla 3.1, Figura 3.7). Esta asignación se ha confirmado mediante una serie de experimentos NOESY-1D selectivos, al observarse efecto NOE en el sistema AB de los protones metilénicos del residuo de glicina (3.82 y 3.79 ppm) cuando se satura la señal de los H δ de la prolina (3.44-3.23 ppm) en el cónformero mayoritario y ausencia del mismo cuando se saturan los mismos protones en el minoritario. La integración cuidadosa de los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN permitió determinar la población de ambos cónformeros como 19% de *cis* y 81% de *trans*.

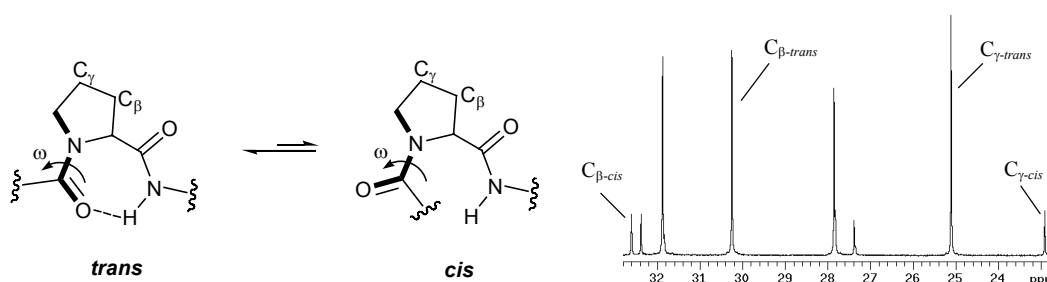


Figura 3.7. Rotamería *cis/trans* en torno al enlace Gly-Pro y espectro de ^{13}C -RMN de GPE a 125 MHz de la zona de los carbonos β y γ .

Equilibrio conformacional del anillo de pirrolidina

El estudio del equilibrio conformacional del anillo de pirrolidina se ha llevado a cabo utilizando el concepto de *pseudorotación*⁷⁰. Los parámetros conformacionales ν_{\max} y P se relacionan con los ángulos de torsión endocíclicos χ_j del anillo de pirrolidina mediante la ecuación [1]:

$$\chi_j = \nu_{\max} \cos(P + 144^\circ j) \quad [1]$$

donde el ángulo de fase P indica la localización específica de una conformación en el circuito pseudorotacional (Figura 3.2) y varía entre 0° y 360°, ν_{\max} es la amplitud del

plegamiento que da el máximo umbral a los cinco valores de χ , y j es un número entero que varía de 0 a 4.

Para poder relacionar estos parámetros con los datos experimentales obtenidos de RMN, es necesario deducir a partir de dichos ángulos el valor de los ángulos diedros interprotónicos correspondientes, ya que las constantes de acoplamiento vecinales a tres enlaces dependen de dichos ángulos según la ecuación original de Karplus⁸⁴. Los ángulos endocíclicos χ_j se relacionan con los ángulos exocíclicos del anillo θ_{Hx-Hy} mediante una simple relación lineal [2]:

$$\theta_{Hx-Hy} = A\chi_j + B \quad [2]$$

siendo A la corrección de la fase y B el ángulo a introducir para la conexión entre ambos. Los valores utilizados para A y B han sido extraídos de las parametrizaciones realizadas por Altona et al.^{85b}.

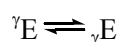
Con este protocolo es posible combinar el concepto de *pseudorotación* con la dependencia de las constantes de acoplamiento con los ángulos diedros interprotónicos. La comparación de las constantes calculadas para cada valor de P del circuito pseudorotacional con las obtenidas experimentalmente, nos proporciona el valor de P del confórmero mayoritario en disolución. Se han realizado muchas mejoras a la ecuación original de Karplus, ya que se ha demostrado que las constantes de acoplamiento, aunque dependen mayoritariamente de los ángulos diedros, también dependen de otros factores como la orientación o la electronegatividad de los sustituyentes del fragmento bajo estudio⁸⁵. Para tener en cuenta estos factores, en esta memoria se ha utilizado la ecuación de Altona parametrizada [3]^{85a} para establecer dicha relación:

$$^3J_{H,H} = P_1 \cos^2 \theta + P_2 \cos \theta + P_3 + \sum \Delta\chi_i [P_4 + P_5 \cos^2 (\xi_i \theta + P_6 |\Delta\chi_i|)] \quad [3]$$

donde P_1 - P_6 son parámetros empíricos, ξ es la variable que introduce el efecto de la posición de los sustituyentes y $\Delta\chi_i$ es la variable que tiene en cuenta la electronegatividad de los mismos, y viene dada por:

$$\Delta\chi^{grupo} = \Delta\chi^{sust.\alpha} - P_7 \sum \Delta\chi^{sust.\beta}$$

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, para poder determinar experimentalmente la conformación del anillo de pirrolidina, siempre que exista únicamente una conformación, sólo sería necesario conocer los valores de P y v_{\max} , por lo que bastaría con medir de forma precisa dos constantes de acoplamiento vecinales entre los protones del anillo. Sin embargo, en la mayoría de los estudios conformacionales realizados en prolinas no se observa una única conformación para el anillo de pirrolidina, sino la existencia de un equilibrio entre dos conformaciones:



por lo que las constantes de acoplamiento observadas experimentalmente son valores promedio de acuerdo con la ecuación^{85b}:

$${}^3J_{(H,H)exp.} = N_I * {}^3J_{(H,H)I} + N_{II} * {}^3J_{(H,H)II} \quad [4]$$

$$N_I + N_{II} = 1 \quad [5]$$

donde ${}^3J_{(H,H)exp}$ es el valor medido de la constante de acoplamiento para un fragmento determinado, N_I y N_{II} son las fracciones molares de cada confórmero y ${}^3J_{(H,H)I}$ y ${}^3J_{(H,H)II}$ las constantes de acoplamiento para cada confórmero aislado. En este caso tenemos cinco variables que determinar (P_I , $v_{\max,I}$, P_{II} , $v_{\max,II}$ y N_I). Para que el sistema tenga una solución no indeterminada necesitamos por lo menos cinco observables (cinco constantes de acoplamiento experimentales), con lo que podremos calcular los valores de P y v_{\max} correspondientes a cada confórmero, así como sus poblaciones.

El análisis del espectro de 1H -RMN de GPE no permitió la medida directa de un número suficiente de constantes de acoplamiento, debido tanto a la superposición de las señales de los dos subespectros, como a los efectos de segundo orden que aparecen en los mismos, por lo que fue necesario simular el espectro de 1H -RMN mediante un programa de cálculo espectral que permite, por iteración de los parámetros de partida (desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento), conseguir un espectro que reproduzca el contorno experimental. Este cálculo se realizó, para el confórmero *trans*, utilizando el programa gNMR v 4.0, obteniendo una serie de parámetros (Tabla 3.2) que

reproducen con una buena concordancia el espectro experimental (Figura 3.8). En el caso del conformero *cis*, debido a su baja población y al solapamiento de sus señales, sólo se pudieron obtener algunas $^3J_{Hx-Hy}$ medidas directamente del espectro (Tabla 3.2).

El conjunto de valores de las constantes de acoplamiento experimentales obtenidas por medida directa del espectro de ^1H -RMN de GPE (Tabla 3.2) no es compatible con la hipótesis de una única conformación para el anillo de pirrolidina, para ninguno de los dos conformeros *cis* y *trans*, por lo que hay que asumir la existencia de un equilibrio conformacional.

Tabla 3.2. Constantes de acoplamiento^a $^3J_{Hx-Hy}$ experimentales del espectro de ^1H -RMN de GPE^b.

	NH-H _{α}	H _{α} H _{β}	H _{α} H' _{β}	H _{β} H _{γ}	H _{β} H' _{γ}	H' _{β} H _{γ}	H' _{β} H' _{γ}	H _{γ} H _{δ}	H _{γ} H' _{δ}	H' _{γ} H _{δ}	H' _{γ} H' _{δ}
<i>cis</i> ^c											
Pro		9.0	2.9								
Glu	7.8					7.3	7.3				
<i>trans</i> ^c											
Pro		8.5	4.7	8.6	6.8	6.5	7.4	7.7	6.1	6.5	7.4
Glu	7.6	4.8	8.9	8.4	7.5	7.0	7.5				

a) Valores en Hz. b) Las J del rotámero *trans* han sido obtenidas por simulación espectral mientras que las J del rotámero *cis* se midieron directamente del espectro experimental de ^1H -RMN. c) Los H del residuo de prolina sin el símbolo '*prima*' se encuentran en el mismo plano al H _{α} , mientras que los marcados como '*prima*' se disponen en el plano opuesto.

Para comprobar si es cierta la hipótesis⁶⁹ de un equilibrio conformacional $^7\text{E} \rightleftharpoons ^7\text{E}$, se determinaron las constantes de acoplamiento teóricas $^3J_{Hx-Hy}$ para cada uno de los dos conformeros ^7E ($P = 270^\circ$) y ^7E ($P = 90^\circ$) (Tabla 3.3), y se evaluó la población de cada conformero en el equilibrio mediante la ecuación [4] dando un valor de poblaciones de 1:1 para el conformero *trans* y de 2:1 para el conformero *cis*. Las pequeñas desviaciones observadas en algunos valores pueden ser debidas a la participación en el equilibrio de otros conformeros minoritarios.

Finalmente, se contrastaron estos resultados con los obtenidos mediante la simulación de dinámica molecular. Tal como se puede ver en la Figura 3.9 para el conformero *trans* la superposición de las conformaciones obtenidas muestra como las dos

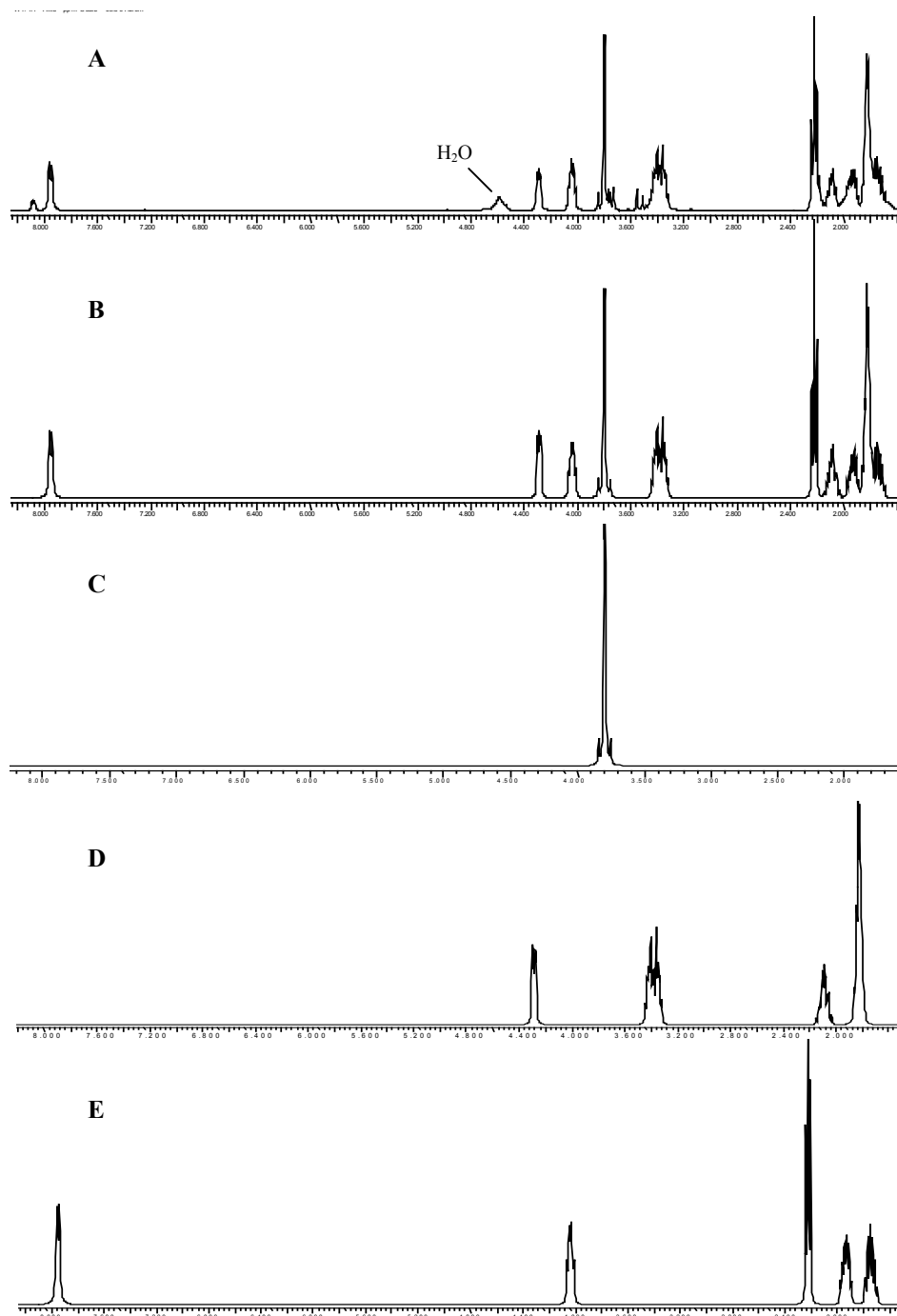


Figura 3.8. Comparación del espectro de ^1H -RMN de GPE experimental (400 MHz, Fig. A), y el obtenido por simulación espectral del rotámero *trans* (B), mediante la suma de los espectros de sus residuos integrantes, glicina (C), prolina (D) y glutámico (E).

Tabla 3.3. Comparación entre las $^3J_{H_X-H_Y}$ experimentales y calculadas (en Hz) para el equilibrio conformacional ${}^{\gamma}E$ y ${}^{\gamma}E$ del residuo de prolina^a.

	${}^{\gamma}E$ (P=270°)		${}^{\gamma}E$ (P=90°)		J ${}^{\gamma}E: {}^{\gamma}E$ (1:1)	J ${}^{\gamma}E: {}^{\gamma}E$ (2:1)	J_{exp} <i>trans</i>	J_{exp} <i>cis</i>
	Φ_{cal}	J_{cal}	Φ_{cal}	J_{cal}				
$H_{\alpha}H_{\beta}$	17.4°	9.2	-20.8°	8.6	8.9	9.0	8.5	9.0
$H_{\alpha}H'_{\beta}$	-103.8°	0.3	-142.0°	8.5	4.4	2.9	4.7	2.9
$H_{\beta}H_{\gamma}$	-30.4°	9.1	31.4°	8.8	8.9	9.0	8.6	---
$H_{\beta}H'_{\gamma}$	-152.6°	11.4	-90.8°	0.3	5.8	7.7	6.8	---
$H'_{\beta}H_{\gamma}$	90.8°	0.3	152.6°	11.4	5.8	4.0	6.5	---
$H'_{\beta}H'_{\gamma}$	-31.5°	8.6	30.3°	9.1	8.9	8.8	7.4	---
$H_{\gamma}H_{\delta}$	31.0°	7.7	-30.8°	8.3	8.0	7.9	7.7	---
$H_{\gamma}H'_{\delta}$	-90.6°	1.0	-152.4°	10.6	5.8	4.2	6.1	---
$H'_{\gamma}H_{\delta}$	153.1°	10.7	91.3°	1.0	5.8	7.5	6.5	---
$H'_{\gamma}H'_{\delta}$	31.6°	7.5	-30.2°	7.7	7.6	7.6	7.4	---

a) Las J del rotámero *trans* han sido obtenidas por simulación espectral mientras que las J del rotámero *cis* se midieron directamente del espectro experimental de 1H -RMN (Tabla 3.2).

conformaciones más abundantes son ${}^{\gamma}E$ y ${}^{\gamma}E$, lo que está totalmente de acuerdo con los resultados obtenidos del estudio de RMN. Adicionalmente, a lo largo del proceso de DM se siguió la evolución del ángulo χ_{11} , que definía el plegamiento del anillo de pirrolidina. Éste mostró un reparto de población aproximadamente 1:1 entre las dos conformaciones tipo *sobre* ${}^{\gamma}E$ y ${}^{\gamma}E$ en el cónfórmero *trans*, y de aproximadamente 3:2 para el cónfórmero *cis* (Figura 3.8), concordante con los resultados cuantitativos obtenidos en el estudio de RMN.

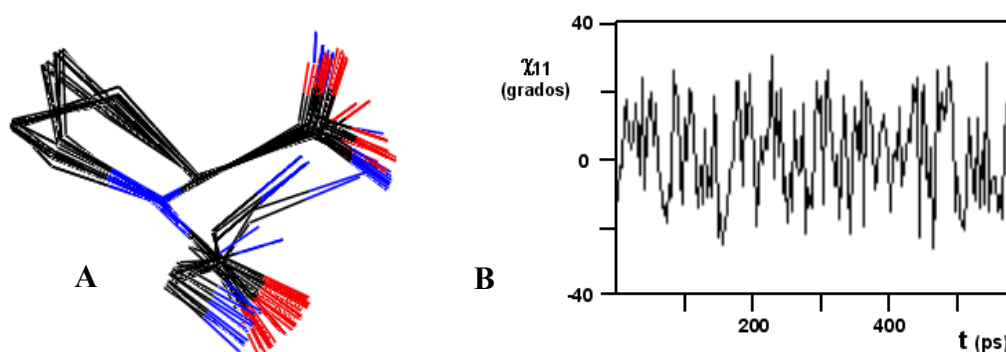


Figura 3.9. (A) Superposición de las estructuras obtenidas por DM para el anillo de pirrolidina del cónfórmero *trans*. (B) Evolución del ángulo χ_{11} a lo largo del proceso de DM.

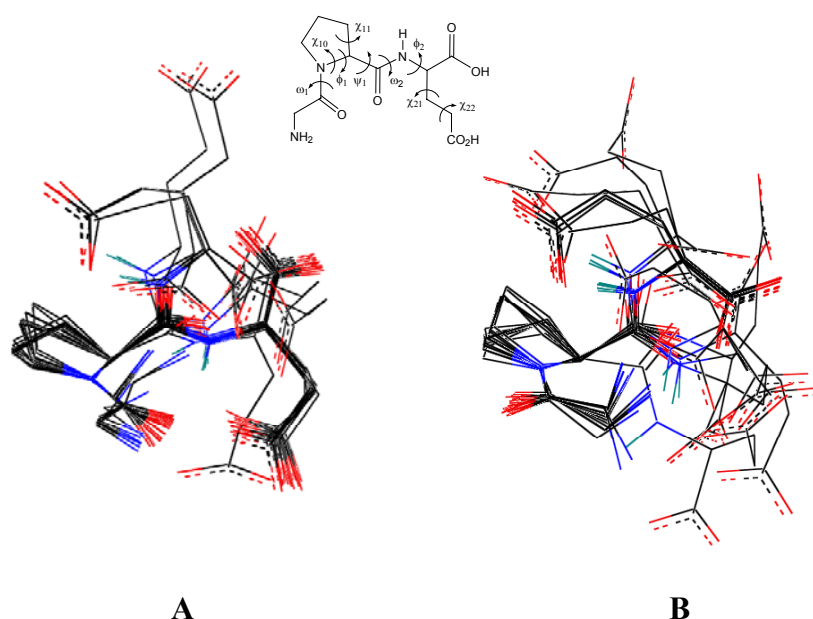


Figura 3.10. Superposición de las estructuras obtenidas por DM para el conformero *trans* (A) y *cis* (B) de GPE. Por simplicidad sólo se muestran los protones amídicos.

El residuo de glutámico y el esqueleto peptídico

El residuo de glutámico de GPE es la parte más flexible de la molécula. El estudio conformacional de esta parte de la molécula se basó fundamentalmente en los resultados obtenidos por la simulación de DM, contrastando estos resultados con los NOEs obtenidos en los experimentos de RMN NOESY y ROESY.

En la Figuras 3.10A y 3.10B se pueden observar las superposiciones de las conformaciones de mínima energía obtenidas en la simulación, para cada una de las dos familias de conformeros *cis* y *trans* de GPE.

El análisis de los ángulos de torsión más relevantes obtenidos en dicho estudio (Tabla 3.4) nos permitió llegar a las siguientes conclusiones:

En el caso de las estructuras con rotamería *trans* en el enlace peptídico Gly-Pro se observó que, para los ángulos diedros que definen la cadena peptídica, existía muy poca variabilidad en los valores correspondientes a ϕ_1 , lo que era evidente si tenemos en cuenta

los resultados encontrados para el anillo de pirrolidina. Se observó, en cambio, una variación mayor para ψ_1 , cuyos valores se movieron en dos intervalos relativamente estrechos (entre $-50^\circ \pm 30^\circ$ y $+120^\circ \pm 30^\circ$). Por último, el ángulo de torsión ω_2 (no mostrado) se mantuvo en valores muy cercanos a 180° en todas las estructuras, lo que está de acuerdo con lo esperado para residuos α -aminoácidos⁷³.

El análisis de los ángulos de torsión y distancias internucleares más relevantes, obtenidos en la simulación para la cadena lateral de glutámico, indicó que en esta parte de la molécula existía una mayor libertad de giro, adoptando unas disposiciones preferentes para el ángulo χ_{21} ($+60^\circ$ y -60°), siendo el ángulo χ_{22} completamente variable (Tabla 3.4).

Finalmente, se realizó un análisis de los datos para intentar identificar si existían enlaces de hidrógeno que estabilizaran determinadas conformaciones. En particular, en el caso de la familia de conformaciones de GPE con enlace Gly-Pro en disposición *trans*, se tuvo en cuenta la posibilidad de la existencia de un giro γ formado por los tres aminoácidos. Sin embargo, no se encontraron, en la simulación realizada, estructuras en donde la distancia entre el grupo CO del residuo de glicina (residuo i) y el NH del residuo de glutámico (residuo i+2) fuera apropiada para la formación de un enlace de hidrógeno que diera lugar al pseudociclo de siete eslabones, característico de este tipo de giros (ver Apartado 1.2, Figura 1.5). En consecuencia, descartamos la existencia de giros γ . Si se observó, en cambio, la existencia de un amplio número de conformaciones estabilizadas por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el CO_2^- de la cadena lateral de glutámico y el NH amídico. Asimismo, se observó un número menor de conformaciones estabilizadas por una interacción electrostática entre el extremo *N*-terminal y dicho carboxilato.

El estudio de los NOESY y ROESY nos permitió identificar la presencia de algunas de estas conformaciones en disolución acuosa. En particular, las señales de correlación observadas, tanto en el NOESY como en el ROESY, para el protón amídico Glu-NH del conformero *trans* fueron muy significativas. Como puede observarse en las Figuras 3.5, 3.6 y 3.11, aparecen dos señales de correlación intensas con el protón H_α -Pro y con el protón H_β -Glu a 1.75 ppm respectivamente y otras dos señales de intensidad

Tabla 3.4. Valores de los ángulos diedros (en grados) más relevantes del esqueleto peptídico de las principales familias de menor energía encontradas en la simulación^a.

Rotámero	ω_1	ϕ_1	ψ_1	χ_{21}
<i>trans</i>	180±15	-49±15	-54±30	60±15
	180±15	-53±15	-55±15	-60±15
	180±15	-43±10	-57±15	-120±15
	180±15	-50±10	130±30	60±15
	180±15	-52±10	122±15	-60±15
	180±15	-62±5	127±15	0±30
<i>cis</i>	0±15	-52±5	-44±15	60±15
	0±15	-63±15	-65±30	-60±15
	0±15	-71±5	-41±15	30±15
	0±15	-58±15	-58±30	-30±15
	0±15	-54±10	-50±30	120±15
	0±15	-57±10	-50±30	-120±30
	0±15	-65±10	-19±15	60±30
	0±15	-69±5	-15±30	-60±30
	0±15	-66±5	-20±15	-30±15
	0±15	-79±10	127±30	60±30
	0±15	-68±15	117±30	-60±15
	0±15	-58±10	130±15	-120±30
	0±15	-71±15	173±15	-60±30

a) Debido al amplio intervalo de valores encontrados para los ángulos ϕ_2 y χ_{22} , no han sido representados en la Tabla.

media con los protones H_{α} -Glu a 1.94 y H_{γ} -Glu. Sin embargo, las señales de correlación con los dos protones H_{β} -Pro son muy débiles en comparación con las anteriores. Este conjunto de señales de correlación sugieren la existencia de una población mayoritaria de conformaciones globales para GPE, en donde el ángulo ψ_1 toma un valor alrededor de 120°, lo que facilita que ambos protones (NH amídico y H_{α} -Pro) se dispongan en *syn*, aunque no se pueda descartar la existencia de otras conformaciones en torno dicho ángulo. Igualmente, la mayor intensidad de la señal de correlación con H_{γ} -Glu que con H_{α} -Glu, sugiere la presencia de conformaciones globales en donde la cadena de glutámico está plegada, posiblemente por efecto de un puente de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutámico y el NH amídico. Por otra parte, el protón H_{α} -Pro muestra dos señales de correlación intensas con el protón NH-Glu y con el protón H_{β} -Pro a 2.09 ppm y otras dos señales de menor intensidad con los protones H_{β} -Pro a 1.82

ppm y H_γ -Glu a 2.23 ppm. En base a dicha información podemos asignar la señal que aparece a 2.09 ppm al protón H_β -Pro que se encuentra en el mismo plano que H_α -Pro, mientras que la correlación H_α -Pro y H_γ -Glu corrobora la hipótesis anterior. Por último, el protón H_α -Glu muestra una señal de correlación intensa con el protón H_β -Glu a 1.94 ppm, y una señal de correlación débil con el protón H_β -Glu a 1.75 ppm. La diferencia de intensidades entre estas dos señales sugiere la existencia de dos rotámeros mayoritarios en torno al enlace C_α - C_β de la cadena lateral de glutámico en la que uno de los H_β se encuentra en torno a 180° del H_α ($^3J_{H\alpha H\beta}$ alta, NOE débil), y el otro en torno a 60° ó -60° ($^3J_{H\alpha H\beta}$ media-baja, NOE intenso).

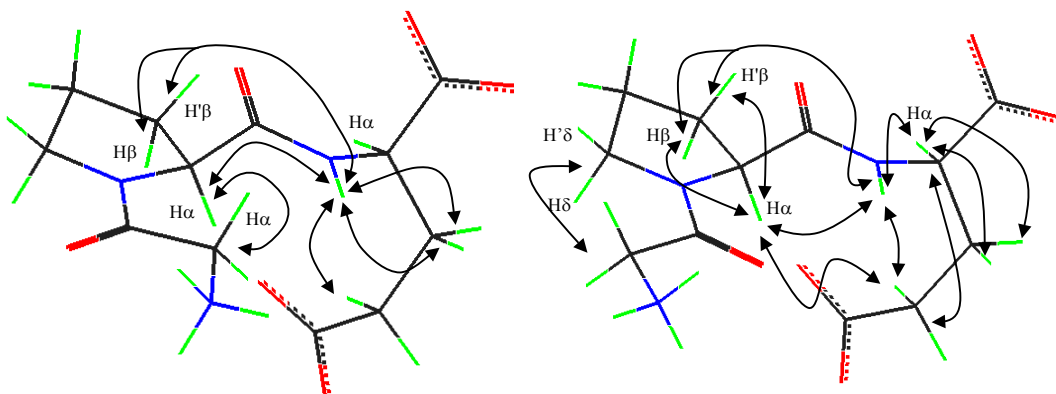


Figura 3.11. Correlaciones NOE observadas para el conformero *cis* (A) y *trans* (B) de GPE.

En el caso de las estructuras con rotamería *cis* en el enlace peptídico Gly-Pro y se observaron, en el proceso de DM, resultados ligeramente más negativos para ϕ_1 y una dispersión mayor de valores para el ángulo ψ_1 (Tabla 3.4). Además, se observó una gran flexibilidad para la cadena lateral de glutámico.

Las señales de correlación observadas tanto en el NOESY como en el ROESY para el conformero *cis*, no fueron tan numerosas como en el caso del *trans*, debido a la baja población y a la superposición de algunas señales. Sin embargo, la resonancia del protón amídico era totalmente identificable, por lo que se pudieron sacar algunas conclusiones de sus bandas de correlación. Como puede observarse en las Figuras 3.5, 3.6 y 3.11, en el espectro NOESY aparecen dos señales de correlación intensas con el protón

H_γ -Glu y con el protón H_γ -Pro respectivamente y otras tres señales de menor intensidad con los protones H_α -Pro, H_β -Pro y H_β -Glu. La comparación de este conjunto de señales con las obtenidas para el rotámero *trans* nos indicó la existencia de una mayor flexibilidad en esta parte de la molécula, aunque la presencia de los NOEs entre el NH amídico y H_γ -Glu sugerían igualmente la presencia de conformaciones con un plegamiento en la cadena lateral de glutámico. Estos resultados fueron concordantes con la simulación realizada por DM.

Con el fin de completar estos estudios, e intentar identificar experimentalmente posibles enlaces de hidrógeno, realizamos medidas de coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) sobre las señales NH-Glu de ambos conformeros. Así, los valores observados de $\Delta\delta/\Delta T$ en disolución para cada uno de los rotámeros *cis* y *trans* fueron de -7.7 y -6.7 ppb/K, respectivamente, lo que indicó que el conformero *trans* de GPE posee el protón del NH amídico menos accesible al disolvente que el *cis*, presumiblemente por cierta mayor participación de éste en un enlace de hidrógeno. Aún así, el alto coeficiente que muestran en valor absoluto indica la formación de un enlace de hidrógeno débil.

Por otra parte, en un estudio realizado por Todeschi *et al.*⁸⁶ sobre el comportamiento conformacional del ácido glutámico en agua, se observó que la población de cada una de las distintas conformaciones de la cadena de glutámico que coexisten en disolución acuosa tiene una fuerte dependencia con el pH del medio y, por tanto, con el grado de protonación de los grupos amino y carboxilos del aminoácido. Para comprobar si este hecho se repite en GPE y la población de las distintas conformaciones en disolución acuosa varía con el grado de protonación, realizamos un estudio de ^1H -RMN a diferentes valores de pH. Para ello se prepararon cuatro muestras de GPE con una concentración 10 mM en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ y a valores de pH 2.0, 4.2, 7.6 y 12.3 respectivamente. Tal como se indica en la Tabla 3.5 se observa un claro desplazamiento a campo más alto en los desplazamientos químicos de ^1H -RMN de los H_α de la glicina al pasar a un pH alcalino, así como a un desplazamiento a campo más bajo en los H_β y H_γ del residuo de glutámico al alcanzar pH ácido. Igualmente se observan cambios en la relación de

poblaciones *cis/trans*. Estos resultados indican que la población de las conformaciones que adopta GPE en disolución acuosa está estrechamente relacionada con la protonación y desprotonación de los grupos amino y carboxilo presentes en la molécula.

Tabla 3.5. Datos espectroscópicos más significativos del espectro de ^1H -RMN del conformero mayoritario *trans* de GPE a diferentes valores de pH.

pH	<i>cis:trans</i>	δ (ppm)						J (Hz)			
		Gly-H $_{\alpha}$	Pro-H $_{\alpha}$	Glu-NH	Glu-H $_{\alpha}$	Glu-H $_{\beta}$	Glu-H $_{\gamma}$	Gly- $^2J_{H\alpha-H\alpha}$	Pro- $^3J_{H\alpha-H\beta}$	Glu- $^3J_{H\alpha-NH}$	Glu- $^3J_{H\gamma-H\beta}$
2.0	12:88	3.81 y 3.79	4.26	8.40	4.19	1.99 y 1.79	2.30	-16.2	8.6, 4.3	7.3	7.3
4.2	19:81	3.82 y 3.79	4.29	8.03	4.03	1.94 y 1.75	2.23	-16.6	8.5, 4.7	7.6	7.5
7.6	21:79	3.73 y 3.68	4.25	7.95	3.88	1.80 y 1.67	2.02	-16.6	8.5 y 3.4	7.2	7.9
12.3	nd	3.38	4.22	a	3.89	1.82 y 1.68	2.02	nd	8.5 y 3.7	a	8.1

a) No se observa señal de NH en el espectro.

En resumen, el conjunto de resultados obtenidos de los estudios de RMN y modelización molecular indican que GPE muestra en disolución varias familias de conformeros en equilibrio que, desde el punto de vista energético, se pueden clasificar en *cis* y *trans* según la conformación que adopta el enlace peptídico entre Gly-Pro. Cada una de estas familias de conformaciones muestran un equilibrio $^{\gamma}\text{E} \rightleftharpoons _{\gamma}\text{E}$ en el anillo de pirrolidina de la prolina en una proporción 1:1 en el caso de los rotámeros *trans* y de 2:1 en el caso de los *cis*.

El resto de la cadena peptídica muestra flexibilidad en ambas familias, aunque el espacio conformacional está mas restringido en el caso de los rotámeros *trans* que en el de los *cis*. Además, en ambas familias el residuo de glutámico posee, según los cálculos realizados, bastante flexibilidad, aunque algunas conformaciones globales con plegamientos de la cadena lateral en los conformeros *trans*, son más estables debido bien a enlaces de hidrógeno intramoleculares entre el grupo carboxilato de esta cadena y el NH del enlace Pro-Glu o a interacciones electrostáticas entre el extremo *N*-terminal y dicho carboxilato.

Debido a que GPE en disolución no adopta una conformación preferente definida, el estudio de las relaciones conformación/actividad, clave para la búsqueda de miméticos, ha de enfocarse hacia el diseño de una diversidad de análogos con los que seamos capaces de abarcar el mayor espacio conformacional posible, con el fin de ir delimitando la(s) posible(s) conformación(es) bioactiva(s).

3.2. TRIPEPTIDOS ANÁLOGOS DE GPE

Siguiendo la aproximación general estructura/conformación/actividad hacia el diseño de peptidomiméticos basados en la estructura del péptido nativo (Figura 1.4), la siguiente etapa ha estado dirigida hacia la identificación de los aminoácidos claves de GPE para su actividad biológica. En un estudio previo realizado por Sara y colaboradores¹¹ se ensayó la fijación a receptores NMDA de los dipéptidos Pro-Glu y Gly-Pro frente a GPE, siendo la afinidad del primero de ellos de dos a tres veces menor que la del propio GPE, mientras que el dipéptido Gly-Pro no mostró afinidad a concentraciones inferiores a 1000 μ M. Este ensayo demostró, por tanto, que el residuo de glutámico es esencial para la unión a dichos receptores y que el residuo de glicina potencia este efecto, por lo que parece que el propio tripéptido es el fragmento mínimo necesario para la actividad.

La simplicidad estructural de GPE convierte a este tripéptido en un producto de partida, en principio fácilmente abordable, para la búsqueda de análogos no peptídicos que puedan mimetizar sus efectos neuroprotectores. Para empezar a abordar este objetivo, se han sintetizado y evaluado tres series de análogos de GPE de fórmula general AA₁-Pro-Glu, Gly-AA₂-Glu y Gly-Pro-AA₃, respectivamente, así como los correspondientes diastereoisómeros de GPE portadores de uno o ambos de sus aminoácidos quirales con configuración D, que nos permitirán conocer en conjunto la importancia de la naturaleza y disposición de las cadenas laterales que lo forman⁸⁷. Así, en la serie de análogos de

fórmula AA₁-Pro-Glu, el residuo de Gly de GPE se ha sustituido por aminoácidos tales como Ala, D-Ala, Phe, Lys, Asp, Nle e Ile^{87b}. También se ha incorporado un resto acetilo en la glicina, y, por último, se ha reemplazado dicho aminoácido *N*-terminal por el resto de Ac.

Por otro lado, las diferentes modificaciones que se introdujeron en el residuo de glutámico (Gly-Pro-AA₃) tuvieron como objeto establecer la influencia de la longitud de la cadena de glutámico en la actividad biológica^{87a}. Para ello se incorporaron los residuos de homoglutámico (Hgl) y aspártico (Asp), homólogos superior e inferior del Glu, tanto de configuración L como D, así como el residuo de D-glutámico. Además, con el fin de determinar la influencia del grupo ácido en posición *C*-terminal, éste se sustituyó por la agrupación CO₂NHMe, dejando la posición *N*-terminal libre, o acetilada.

Por último, hemos sintetizado una diversidad de análogos de estructura Gly-AA₂-Glu en los que el residuo de Pro de GPE se ha sustituido por varios aminoácidos capaces, en principio, de alterar de manera muy diferente las conformaciones del tripéptido y, por tanto, de influir considerablemente en su actividad biológica^{87a, c, 88}. Así, en relación con la existencia de rotámeros *cis* y *trans* alrededor del enlace AA_n-Pro comentada para GPE en el capítulo anterior, Lubell y Mütter han utilizado diversas alquilprolinas^{89, 90} y pseudoprolinas (ΨPro)^{91, 92}, (AA_n[Ψ^{R1R2}pro], AA_n = Cys, Ser, Thr), con objeto de modificar la relación entre ambos conformeros y estudiar la influencia en la conformación bioactiva del péptido en cuestión⁹³. En este sentido, el ácido 2,2-dimetiltiazolidin-4(*R*)-carboxílico Cys[Ψ^{Me,Me}pro] (dmT), (Figura 3.12), fácilmente accesible a partir de cisteína, se ha descrito como una herramienta para incrementar hasta un 100% la población de la conformación *cis*⁹⁴, mientras que la (*S*)-α-metilprolina (P^{Me}) induce un aumento considerable de la forma *trans*⁹⁵. Por ello, hemos sintetizado los derivados de GPE incorporando los residuos de dmT y P^{Me}, respectivamente, en lugar de Pro. Por otro lado, es conocido que la presencia del átomo de azufre en el anillo de tiazolidina altera el plegamiento del anillo de la pseudoprolina en comparación con la prolina^{92, 96} lo que podría conllevar importantes cambios conformacionales. Por ello, para determinar la influencia del empaquetamiento del anillo de prolina en el efecto neuroprotector de GPE,

hemos incorporado también los residuos de Cys[$\Psi^{\text{H}}, \text{H}$ pro] (Thz) y L- y D-5,5-dimetilprolina (dmP)^{97, 98} (Figura 3.12) en este tripéptido endógeno. Otros derivados de prolina utilizados han sido las prolinas 4-sustituídas 4-(*S*)-aminoprolina (amp) y 4-(*R*)-hidroxiprolina (Hyp)⁹⁰ por sus características estereoelectrónicas, además de haberse observado que la introducción de sustituyentes electronegativos en posición 4 son capaces de alterar tanto el plegamiento del anillo como la proporción de conformeros *cis/trans* según la configuración de dichos sustituyentes⁹⁹, y así la conformación de la molécula. También se han incorporado los homólogos superior e inferior de prolina, ácido piperídico (Pip) y azetidina (Aze)¹⁰⁰, así como los bicíclos (2,3,7a) ácido octahidro-1*H*-indol-1-carboxílico (Oic) y ácido 7-azabíciclo[2.2.1]-heptano-1-carboxílico (Ahc)¹⁰¹ con el fin de disminuir (Pip) y aumentar el grado de restricción conformacional del anillo de pirrolidina de la Pro. Como complemento final de esta serie de cambios de prolina se han introducido los aminoácidos carbocíclicos con el C- α cuaternario 1-aminociclopropanoico (Acp) y 1-aminociclohexanoico (Ach), los cuales poseen el grupo amino exocíclico y, por último, se han sintetizado los análogos que incorporan D-Pro y D-Pro-D-Glu.

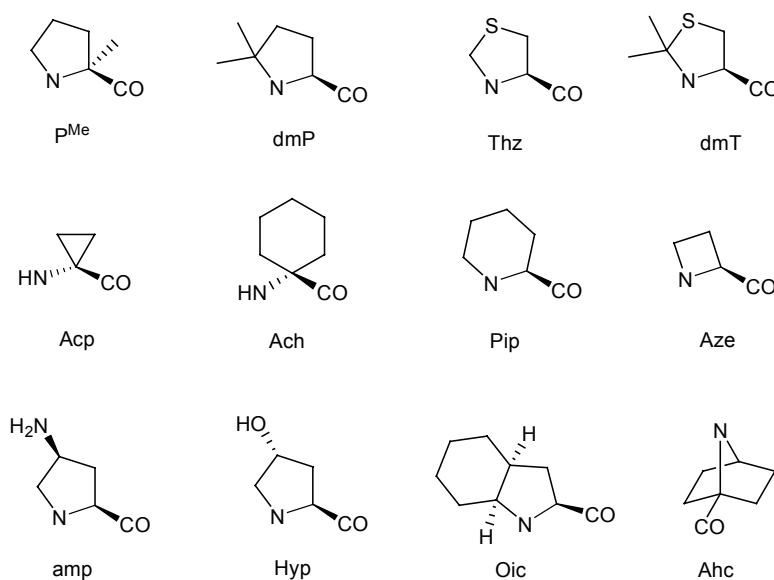


Figura 3.12. Sustitutos del residuo de prolina utilizados en los derivados Gly-AA₂-Glu.

En resumen, las tres series de compuestos sintetizados mediante sustitución secuencial de los tres aminoácidos integrantes de GPE se indican en la Figura 3.13:

AA ₁ -Pro-Glu	Gly-Pro-AA ₃	Gly-AA ₂ -Glu
14 AA ₁ = Ala	23 AA ₃ = Asp	30 AA ₂ = Acp
15 AA ₁ = D-Ala	24 AA ₃ = D-Asp	31 AA ₂ = Ach
16 AA ₁ = Phe	25 AA ₃ = D-Glu	32 AA ₂ = Pip
17 AA ₁ = Asp	26 AA ₃ = Hgl	33 AA ₂ = Aze
18 AA ₁ = Lys	27 AA ₃ = D-Hgl	34 AA ₂ = amp
19 AA ₁ = Nle	28 AA ₃ = Glu-NHMe	35 AA ₂ = Hyp
20 AA ₁ = Ile	29 Ac-Gly-Pro-Glu-NHMe	36 AA ₂ = Oic
21 AA ₁ = Ac-Gly		37 AA ₂ = Ahc
22 AA ₁ = Ac		38 AA ₂ = dmT
		39 AA ₂ = P ^{Me}
		40 AA ₂ = Thz
		41 AA ₂ = dmP
		42 AA ₂ = D-dmP
		43 AA ₂ = D-Pro
		44 Gly-D-Pro-D-Glu

Figura 3.13. Resumen de los análogos tripeptídicos de GPE sintetizados.

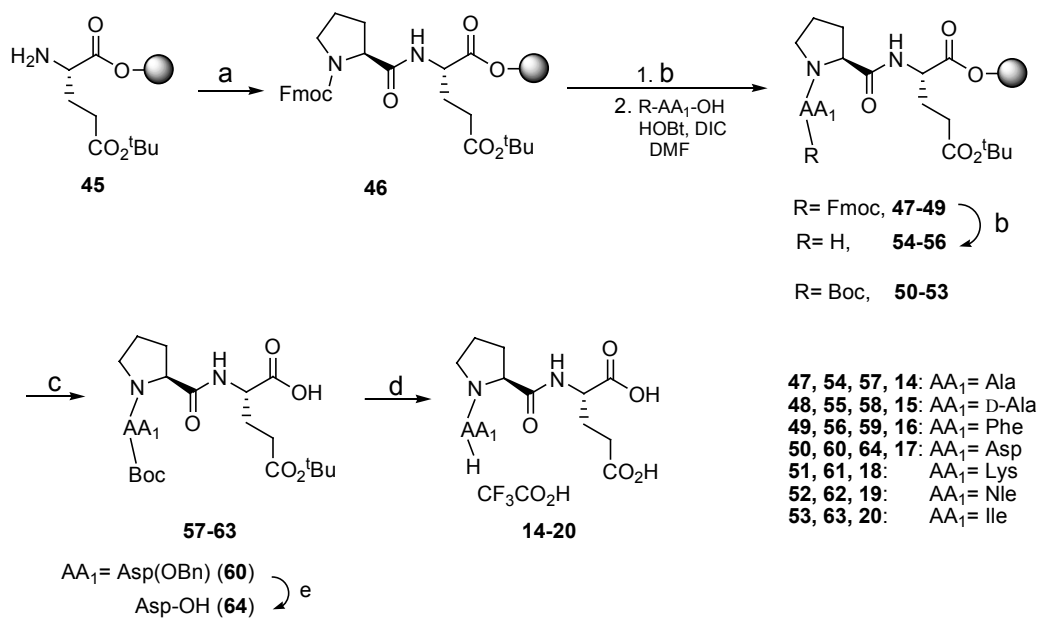
Durante el transcurso de este trabajo fue publicada la síntesis los tripeptidos derivados de L y D-Ala **14** y **15**, D-Glu **25** y Glu-NHMe **28**¹⁰². Aun así, se decidió continuar con la síntesis de los mismos con el fin de evaluar su actividad biológica y compararla con la del resto de los análogos. Por otra parte, la síntesis de **14** y **15** fue realizada por los mismos autores en disolución^{102b}, mientras que en nuestro caso se realizó en fase sólida, como se refleja en el apartado siguiente.

3.2.1. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE GPE MODIFICADOS EN EL RESIDUO DE GLICINA

La síntesis de los análogos de GPE **14-20** se llevó a cabo siguiendo la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida con esquema de protección Fmoc/^tBu, utilizando como reactivos de acoplamiento DIC y HOBt y como matriz polimérica una

resina del tipo 2-clorotritilo para evitar la formación de dicetopiperazinas en la misma resina, favorecida por la posición del residuo de prolina¹⁰³, y así minimizar la pérdida de dipéptidos *C*-terminales. La resina elegida **45** tiene el residuo de glutámico incorporado y el ácido de la cadena lateral viene protegido como éster *tert*-butilico. Estas reacciones se monitorizaron mediante el test de Kaiser en el caso de aminas primarias o el test de cloranilo para aminas secundarias¹⁰⁴. Los aminoácidos protegidos que se utilizaron fueron: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Boc-Asp(OBn)-OH, Boc-Lys(Boc)-OH, Boc-Nle-OH y Boc-Ile-OH.

De esta manera, la resina **45**, cargada con el aminoácido *C*-terminal [H-Glu(O^tBu)-], se preparó para el acoplamiento mediante un proceso de hinchado consistente en lavados sucesivos con DCM/DMF/DCM/DMF (4 x 30 s. cada uno). Una vez hinchada, fue acoplada con el aminoácido central Fmoc-Pro-OH utilizando DIC y HOBt como agentes activantes obteniendo el dipéptido Fmoc-protégido anclado a la resina **46**. Tras la eliminación del grupo protector Fmoc por tratamiento con disolución de piperidina/DMF al 20% (3 x 10 min.), los residuos *N*-terminales fueron incorporados de igual manera obteniéndose los tripéptidos protegidos **47-53** (Esquema 3.1).



- a) Fmoc-Pro-OH, HOBt, DIC, DMF; b) piperidina/DMF 20%; c) AcOH/TFE/ DCM (1:1:8);
 d) TFA, CH₂Cl₂; e) H₂, Pd(C).

Esquema 3.1.

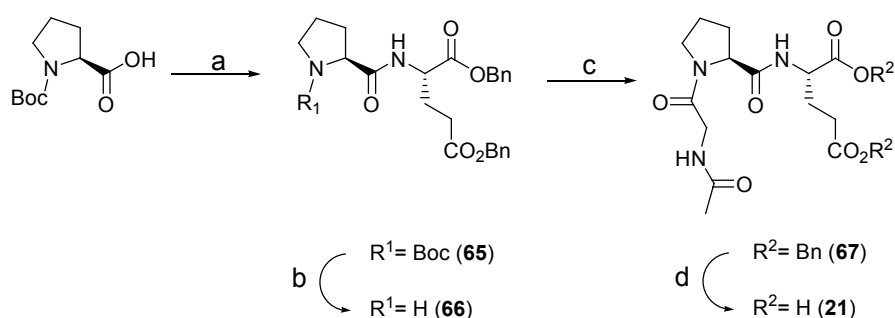
Antes de desanclar los tripéptidos de la resina, fue necesario un nuevo tratamiento con disolución de piperidina/DMF al 20% para los derivados **47-49** con el fin de eliminar el grupo *N*-protector Fmoc, ya que podría ser mucho mas complicada su eliminación en disolución. Esto nos condujo a los derivados **54-56**. Una vez sintetizados los tripéptidos correspondientes, procedimos al desanclaje de la resina mediante tratamiento de **50-56** con una mezcla de AcOH/TFE/DCM en proporción (1:1:8) dejando la mezcla reaccionar durante 3 horas y que, tras filtrar y lavar la resina con más CH₂Cl₂, nos condujo a la obtención de los tripéptidos correspondientes desanclados de la resina **57-63** (Esquema 3.1). El espectro de ¹H-RMN de estos análogos muestra la formación de un único producto y la ausencia de productos secundarios tales como las dicetopiperazinas previamente comentadas, confirmando la validez de nuestra estrategia diseñada para la síntesis de estos tripéptidos análogos de GPE en fase sólida.

Hay que señalar que en el caso del derivado de Asp **60**, fue necesario un paso adicional (paso e, Esquema 3.1) para eliminar el grupo bencilo de la cadena lateral mediante hidrogenación catalítica obteniendo **64**.

Por último, la eliminación del grupo protector *N*-terminal Boc y del grupo éster *terc*-butílico, protector de la cadena lateral del Glu, fue llevada a cabo por tratamiento de los derivados **57-59** y **61-64** con una disolución de TFA en CH₂Cl₂, obteniéndose los correspondientes análogos de GPE desprotegidos **14-20** en altos rendimientos (78-98%) y alto grado de pureza determinado por RMN (>95%).

La síntesis de los análogos de GPE portadores de Ac-Gly **21** y de un resto acetilo en sustitución del residuo de glicina **22**, se abordó mediante síntesis en disolución en tres y dos pasos de reacción respectivamente. La metodología seguida para el acoplamiento entre los distintos aminoácidos supuso la utilización de BOP como agente de acoplamiento y DIEA o Et₃N como base. Así, la primera etapa para la síntesis de **21** supuso el acoplamiento peptídico de Boc-Pro-OH con el clorhidrato de H-Glu(OBn)-OBn obteniendo el dipéptido buscado **65** con un rendimiento del 97% (Esquema 3.2). En este primer acoplamiento se utilizó BOP y DIEA como base para evitar la posible recemización durante el proceso de acoplamiento. La desprotección del grupo *terc*-butoxicarbonilo se llevó a cabo limpiamente en medio ácido por tratamiento con una

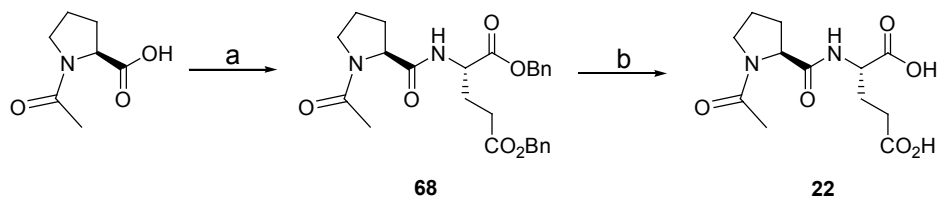
disolución 3.2 M de HCl en AcOEt, que nos condujo a la obtención del dipéptido desprotegido **66** como único producto de reacción en un 98%. Posteriormente se acopló Ac-Gly-OH con **66** utilizando en este caso BOP y Et₃N, que condujo al correspondiente tripéptido **67** (63%). Finalmente, éste fue desprotegido mediante hidrogenación catalítica en presencia de Pd (C) al 10% obteniendo el análogo buscado **21** de manera cuantitativa.



a) H-Glu(OBn)-OBn·HCl, BOP, DIEA; b) AcOEt/HCl; c) Ac-Gly-OH, BOP, Et₃N; d) H₂, Pd (C).

Esquema 3.2.

Para la síntesis de Ac-Pro-Glu-OH (**22**) en un principio se partió del dipéptido *N*-desprotegido **66** y se intentó la reacción de *N*-acetilación tanto con cloruro de acetilo como con anhídrido acético, pero ambas reacciones resultaron infructuosas. La estrategia que se abordó entonces fue partir de la prolina acetilada, disponible comercialmente. De esta manera el acoplamiento entre Ac-Pro-OH y el clorhidrato de H-Glu(OBn)-OBn condujo al dipéptido **68** con un 62% de rendimiento (Esquema 3.3) Por último, **68** fue desprotegido mediante hidrogenación catalítica obteniendo nuestro dipéptido **22** (85%).

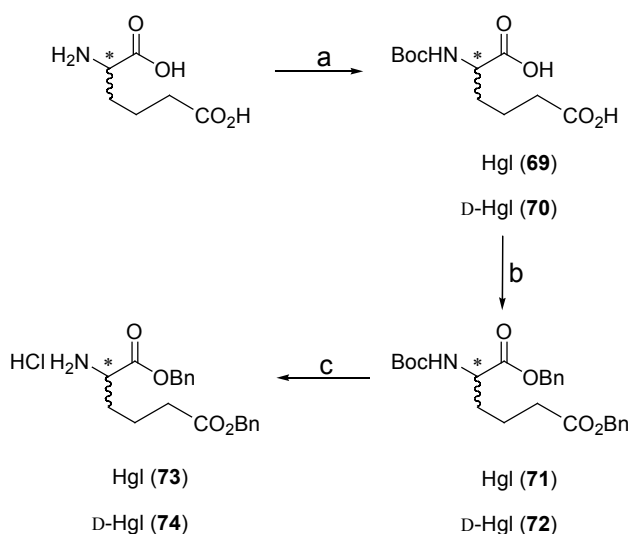


a) H-Glu(OBn)-OBn·HCl, BOP, DIEA; b) H₂, Pd (C).

Esquema 3.3.

3.2.2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE GPE MODIFICADOS EN EL RESIDUO DE GLUTÁMICO

Antes de introducir los residuos de Hgl hubo que proteger adecuadamente ambos grupos carboxilato ya que sólo se disponía del aminoácido sin protección alguna. Para ello, se prepararon los ésteres dibencílicos, de acuerdo con el Esquema 3.4. Puesto que intentos de esterificación con alcohol bencílico y PTSA del aminoácido libre fueron infructuosos recuperando el producto de partida inalterado, se procedió a la formación de los *N*-Boc derivados **69**¹⁰⁵ y **70**¹⁰⁵ para posteriormente formar los ésteres bencílicos **71** y **72** por acoplamiento con BOP y alcohol bencílico. Finalmente se desprotegió el Boc por tratamiento en medio ácido obteniendo los correspondientes clorhidratos **73**¹⁰⁶ y **74** (Esquema 3.4) para su posterior acoplamiento con Z-Gly-Pro-OH.

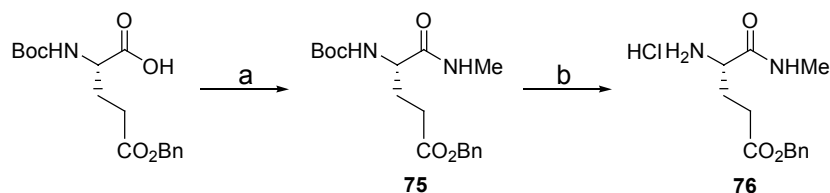


a) $[\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3]_2\text{O}$, Et_3N , DMAP; b) $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$, BOP, DIEA; c) AcOEt/HCl .

Esquema 3.4.

También hubo que preparar la amida *N*-desprotegida derivada de glutámico **76**. Para ello se hizo reaccionar Boc-Glu(OBn)-OH con clorhidrato de metilamina obteniendo

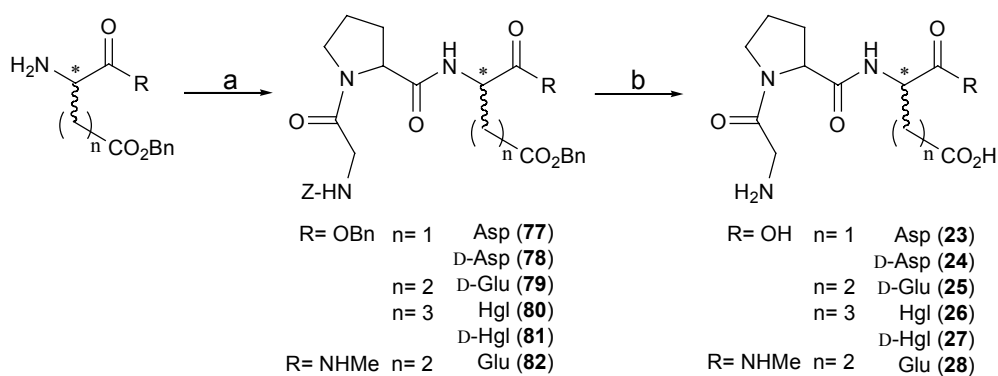
la metilamida **75**¹⁰⁷ que, posteriormente, se trató con disolución de clorhídrico en AcOEt dando el aminoácido *N*-desprotegido **76** cuantitativamente (Esquema 3.5).



a) NHMe·HCl, BOP, DIEA; b) AcOEt/HCl.

Esquema 3.5.

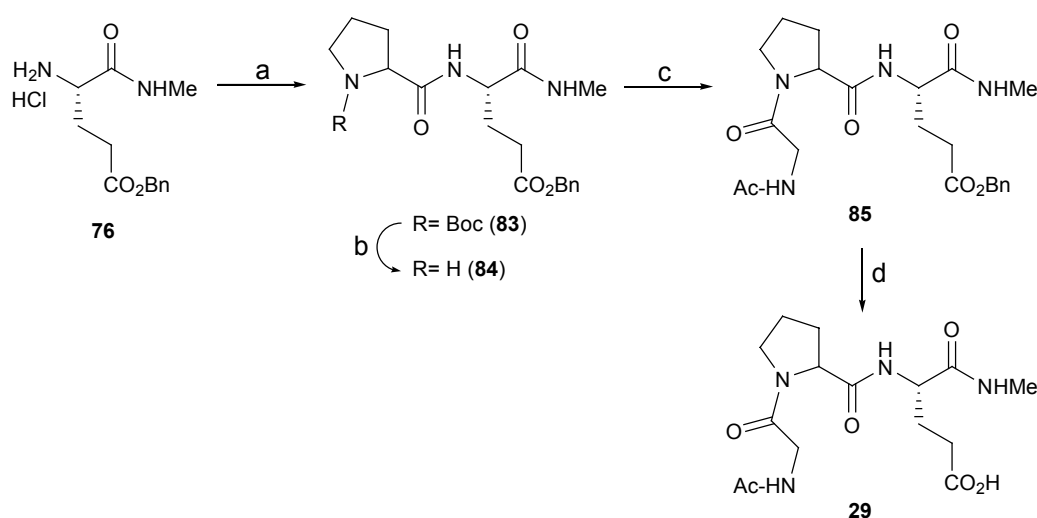
La síntesis de todos los análogos de Glu fue llevada a cabo en disolución. Así, los derivados **23-28** se sintetizaron en dos pasos de reacción por acoplamiento con BOP/DIEA entre el dipéptido comercial Z-Gly-Pro-OH y el aminoácido correspondiente H-Asp(OBn)-OBn, H-D-Asp(OBn)-OBn, H-D-Glu(OBn)-OBn, H-Hgl(OBn)-OBn (**73**), H-D-Hgl(OBn)-OBn (**74**) o H-Glu(OBn)-NHMe (**76**) en forma de clorhidratos, obteniéndose los tripéptidos correspondientes **77-82** con unos rendimientos entre 78% y 94% (Esquema 3.6). A la hora de purificar por cromatografía los tripéptidos derivados de Asp y D-Glu, se observó que el producto final tenía un R_f muy similar al del aminoácido de partida, por lo que hubo que controlar el exceso de reactivo con el fin de facilitar su posterior purificación. Por último, la hidrogenólisis de los tripéptidos protegidos condujo a los análogos de GPE **23-28** con rendimientos cuantitativos.



a) Z-Gly-Pro-OH, BOP, DIEA; b) H₂, Pd (C).

Esquema 3.6.

Por último el derivado **29** fue sintetizado haciendo reaccionar Boc-Pro-OH y **76**, dando lugar al dipéptido **83**, que fue desprotegido mediante TFA obteniendo **84** como sal de trifluoroacetato (Esquema 3.7). Éste fue acoplado con Ac-Gly-OH para dar el tripéptido **85** que, finalmente, fue desprotegido mediante hidrogenación catalítica obteniendo el análogo buscado desprotegido **29** con altos rendimientos.



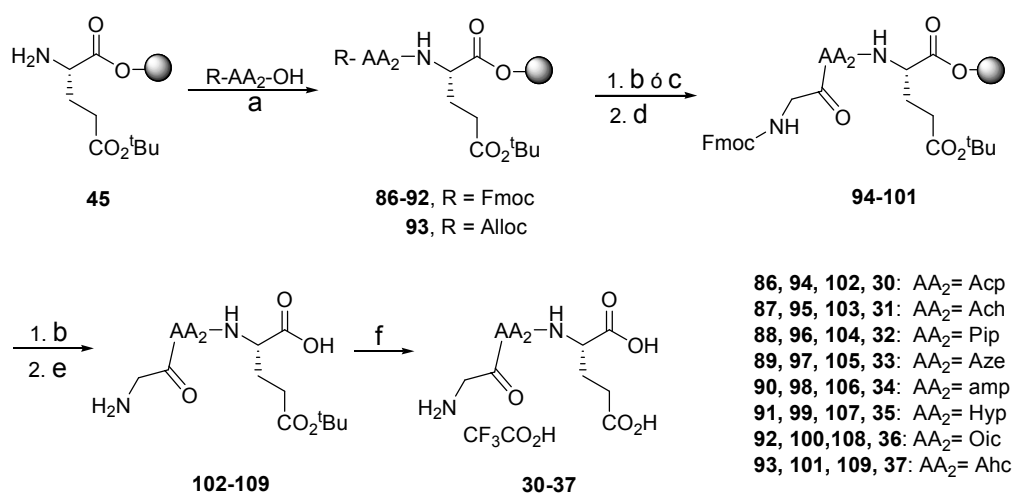
a) Boc-Pro-OH, BOP, DIEA; b) TFA, CH_2Cl_2 ; c) Ac-Gly-OH, BOP, DIEA; d) H_2 , Pd (C).

Esquema 3.7.

3.2.3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE GPE MODIFICADOS EN EL RESIDUO DE PROLINA

La síntesis de los análogos de GPE **30-37** se llevó a cabo siguiendo la misma metodología de síntesis de péptidos en fase sólida utilizada para los análogos de glicina. Los aminoácidos protegidos que se utilizaron para la preparación de estos tripéptidos fueron: Fmoc-Acp-OH, Fmoc-Ach-OH, Fmoc-Pip-OH, Fmoc-Aze-OH, Fmoc-amp(Boc)-OH, Fmoc-Hyp(O^tBu)-OH, Fmoc-Oic-OH y Alloc-Ahc-OH¹⁰¹. Así, la resina **45** utilizada

anteriormente, cargada con el residuo de glutámico, fue hinchada y acoplada con el aminoácido central AA₂ correspondiente utilizando DIC y HOBt como agentes activantes, obteniendo los derivados dipeptídicos **86-93** (Esquema 3.8). Posteriormente se desprotegió la posición *N*-terminal con disolución de piperidina/DMF al 20% (3 x 10 min.) en el caso de que el grupo protector fuera Fmoc, o por tratamiento con tetraquis-(trifenilfosfina)paladio (0) y fenilsilano en el caso del derivado **93**, con un grupo aliloxicarbonilo (Alloc) como grupo protector. Cabe destacar que en la desprotección de **93** fue necesario repetir la reacción dos veces hasta completarse. El siguiente paso fue la introducción de Fmoc-Gly-OH para dar los tripéptidos Fmoc-protectados **94-101** anclados a la resina. Nuevamente el grupo Fmoc fue eliminado por tratamiento con piperidina/DMF y el desanclaje se realizó utilizando una mezcla de AcOH/TFE/DCM (1:1:8) lo que condujo a los análogos **102-109** con excelentes rendimientos (76-99%).



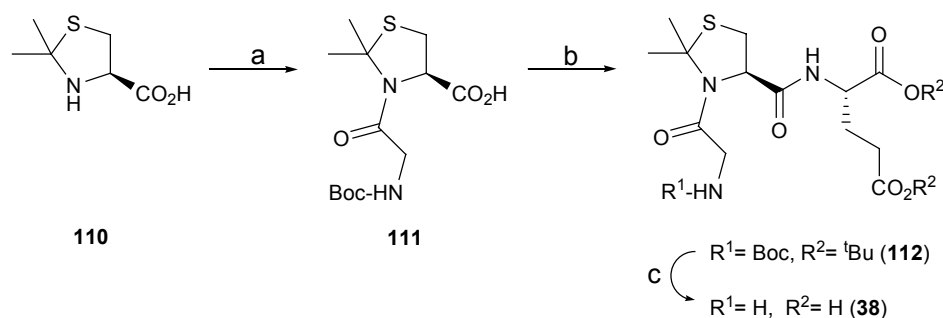
a) HOBt, DIC, DMF; b) R=Fmoc; Piperidina/DMF (20%); c) R=Alloc; PhSiH₃, Pd(PPh₃)₄, CH₂Cl₂, Ar; c) Fmoc-Gly-OH, HOBt, DIC, DMF; e) AcOH/TFE/DCM (1:1:8); f) TFA, CH₂Cl₂.

Esquema 3.8.

El tratamiento de estos análogos con una disolución de TFA en CH₂Cl₂ condujo, en todos los casos, a la desprotección de la cadena lateral del glutámico, junto con la de los grupos 4-hidroxilo y 4-amino del residuo de prolina en los derivados **34** y **35**, para dar

lugar a los tripéptidos totalmente desprotegidos **30-37** con altos rendimientos (71-96%) y alto grado de pureza determinado por RMN (>95%).

La síntesis de los tripéptidos **38-44** indicados en la Figura 3.13, fue llevada a cabo en disolución utilizando en las reacciones de acoplamiento nuevamente BOP como agente de activación de ésteres y DIEA o Et₃N como bases. Para la síntesis de los tripéptidos portadores de los anillos de pseudoprolina **38** y **40** se utilizaron Boc y ésteres *tert*-butilicos como grupos protectores a la hora de introducir los residuos de Gly y Glu ya que el anillo de tiazolidina derivado de cisteína es estable en las condiciones de desprotección de dichos grupos¹⁰⁸. Así, la pseudoprolina H-dmT-OH (**110**), sintetizada previamente en un solo paso de reacción por condensación entre cisteína y acetona¹⁰⁹, fue acoplada con Boc-Gly-OH en una mezcla de DCM/DMF (2:1) obteniendo el derivado dipeptídico **111** con un rendimiento del 26% (Esquema 3.9).

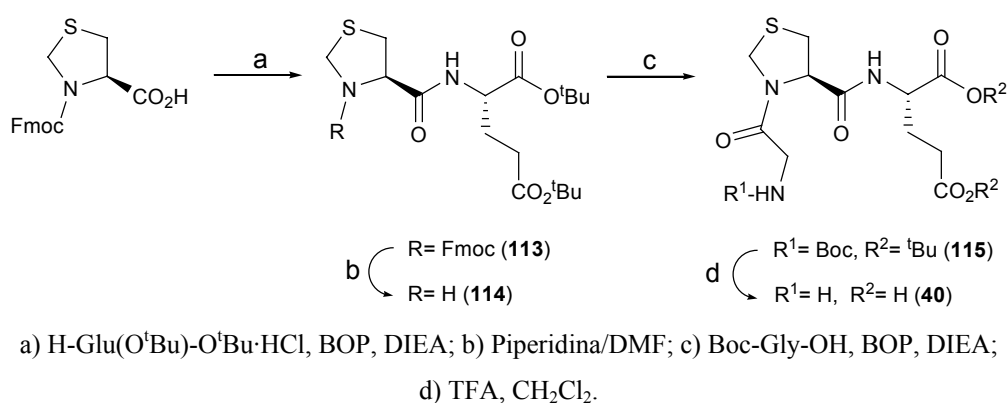


Esquema 3.9.

Posteriormente, el acoplamiento de **111** con el diéster *tert*-butilico de Glu en iguales condiciones pero utilizando CH₂Cl₂ únicamente como disolvente, condujo, con buen rendimiento (69%), al pseudotripeptido correspondiente **112**, que fue desprotegido por hidrólisis en TFA obteniendo el análogo buscado **38**. Es necesario señalar que en un principio la síntesis de **38** se abordó formando primero el pseudodipeptido H-dmT-Glu(O^tBu)-O^tBu, el cual se obtuvo con buenos rendimientos, pero fue imposible la

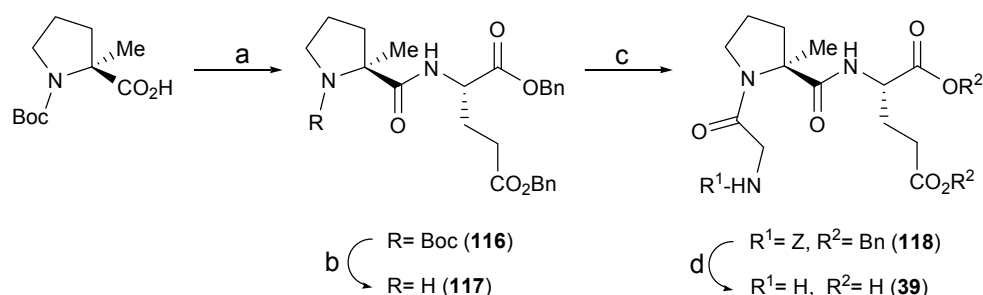
introducción del residuo de Gly aun utilizando agentes de acoplamiento especialmente indicados para reacciones de acoplamientos impedidos (HATU/HOAt, PyAOP).

En el caso del derivado portador de Thz, la síntesis se inició por acoplamiento del derivado comercial, Fmoc-Thz-OH, con glutámico convenientemente protegido obteniendo el dipéptido **113**. Posteriormente el grupo Fmoc fue eliminado por tratamiento con una mezcla de piperidina/DMF (1:4) para dar **114** que fue inmediatamente acoplado con Boc-Gly-OH obteniendo el pseudotripéptido protegido **115** con buenos rendimientos (Esquema 3.10). La eliminación de los grupos protectores Boc/^tBu por medio ácido condujo al tripéptido **40** en un rendimiento global del 56%.



Esquema 3.10.

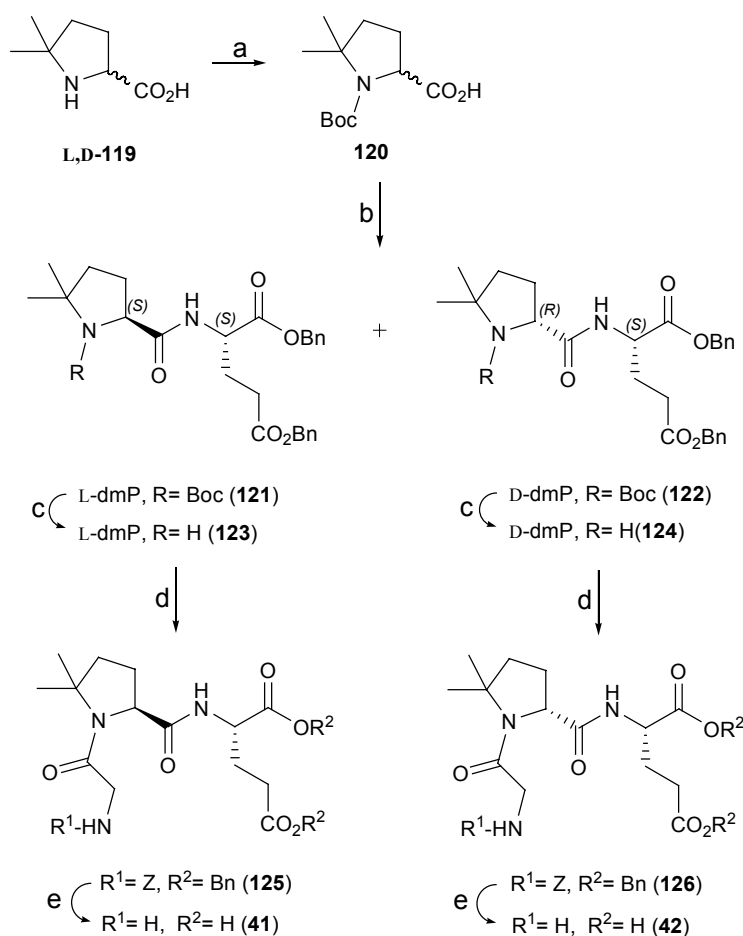
La síntesis del análogo de GPE portador del residuo de P^{Me} fue llevada a cabo acoplado en primer lugar Boc-P^{Me}-OH comercial con H-Glu(OBn)-OBn para dar el dipéptido protegido correspondiente **116** con buenos rendimientos. Posteriormente se eliminó el grupo Boc y el derivado dipeptídico resultante **117** se hizo reaccionar con Z-Gly-OH, utilizando BOP como agente acoplante, obteniendo el tripéptido totalmente desprotegido **118** con un buen rendimiento (72% en la reacción de acoplamiento), a pesar de estar el nitrógeno de la prolina impedido estéricamente por efecto del metilo en α. La desprotección de **118** fue llevada a cabo mediante hidrogenólisis con Pd/C y permitió obtener el análogo buscado **39** de manera cuantitativa (Esquema 3.11).



Esquema 3.11.

Los análogos portadores del residuo de L- y D-5,5-dimetilprolina (dmP) fueron sintetizados, como se muestra en el Esquema 3.12, partiendo de la mezcla racémica de H-dmP-OH (**L,D-119**), sintetizada de acuerdo con el procedimiento descrito⁹⁸. Tras la introducción del grupo protector Boc con pirocarbonato de di-*terc*-butilo, se acopló la mezcla enantiomérica de Boc-dmP-OH (**120**) con H-Glu(OBn)-OBn utilizando BOP como agente activante, obteniendo la correspondiente mezcla diastereomérica de ambos dipéptidos protegidos la cual pudo ser resuelta mediante cromatografía dando lugar a los diastereoisómeros **121** y **122** en una proporción 1:1. Ambos compuestos fueron *N*-desprotegidos por separado por tratamiento en medio ácido y acoplados con Z-Gly-OH utilizando HATU como reactivo de activación para acoplamiento impedido, obteniendo **125** y **126** en excelentes rendimientos (89 y 91%, respectivamente). Finalmente, la hidrogenólisis de los diastereoisómeros **125** y **126** condujo a los tripéptidos desprotegidos, análogos de GPE, **41** y **42** respectivamente de manera cuantitativa.

La asignación configuracional del residuo de dmP de los diastereoisómeros **41** y **42** fue realizada por comparación cromatográfica con el diastereoisómero **41** sintetizado inequívocamente mediante una vía alternativa que implica la resolución de la mezcla racémica de H-dmP-OH (**L,D-119**) por cristalización del enantiómero L con ácido D-tartárico y posterior separación del complejo formado por columna de intercambio iónico⁹⁷.

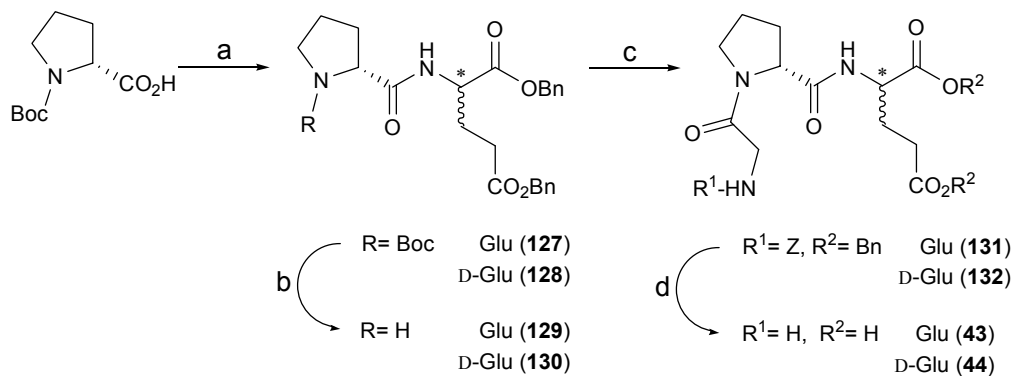


a) $[\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3]_2\text{O}$, Et_3N , DMAP; b) $\text{H-Glu}(\text{OBn})\text{-OBn}\cdot\text{HCl}$, BOP, DIEA; c) HCl/AcOEt ;
 d) Z-Gly-OH , HATU, DIEA; e) H_2 , Pd (C).

Esquema 3.12.

Por último, la síntesis de los análogos de GPE correspondientes a los cambios de prolina por D-Pro y D-Pro-D-Glu **43** y **44** se abordó haciendo reaccionar Boc-D-Pro-OH con los derivados de glutámico de configuración L y D respectivamente, protegidos en forma de éster bencílico (Esquema 3.13). Así, el acoplamiento de dichos aminoácidos condujo a los dipéptidos **127** y **128** en altos rendimientos. El grupo protector Boc fue eliminado por tratamiento con una disolución de HCl/AcOEt dando lugar a los dipéptidos desprotegidos **129** y **130** los cuales fueron inmediatamente acoplados con Z-Gly-OH para obtener los tripéptidos correspondientes **131** y **132**. Finalmente, los grupos bencilo y Z

fueron eliminados mediante hidrogenación catalítica utilizando Pd sobre carbono al 10% dando lugar a los análogos **43** y **44** con excelentes rendimientos globales.



Esquema 3.13.

Ya que, excepto **30** y **31**, todos estos análogos de GPE modificados en el residuo de prolina son susceptibles de mostrar rotamería en torno al enlace Gly-AA₂, se determinó la proporción de rotámeros *cis/trans* por ¹³C-RMN mediante la medida de las integrales de la señal correspondiente al C^α del residuo AA₂ de cada uno de los rotámeros (Tabla 3.6). Como era de esperar, el derivado **39** portador del residuo de P^{Me}, cuyo anillo está descrito como un potente inductor del rotámero *trans*⁹⁵, indujo un incremento en la población *trans* respecto a GPE. Incremento similar fue observado en el análogo **36** poseedor del bicyclo de Octahidroindol. De acuerdo con las expectativas, los derivados con el anillo 5,5-dimetil sustituido **38**, **41** y **42** mostraron un sustancial aumento del conformero *cis*. Así, el análogo derivado de tiazolidina **38** mostró una población *cis* en torno al enlace Gly-dmT prácticamente cuantitativa, mientras que para los análogos de dmP y D-dmP, **41** y **42**, la población observada fue 69:31 y 82:18 respectivamente, suponiendo un incremento en la población del conformero *cis* de un 50% para el de dmP, y más acusado en el caso del análogo de D-dmP (63%). Es importante observar que ninguna de las modificaciones realizadas en posición 4 del anillo de pirrolidina afecta considerablemente a la proporción de rotámeros *cis/trans* respecto a GPE. Como se

observa en la Tabla 3.6, en el caso del análogo de Thz **40**, en el que se ha sustituido el C^γ por un átomo de azufre, la proporción de la población *cis/trans* es muy similar a la de GPE. Hecho similar ocurre con los análogos de amp e Hyp **34** y **35**, en los que a pesar de introducir un grupo electronegativo en la posición 4 del anillo, y con estereoquímica opuesta, los efectos sobre la rotamería *cis/trans* son prácticamente insignificantes. Este hecho fue en cierta medida sorprendente, ya que como se ha indicado anteriormente, esta sustitución debería conducir a cambios en el plegamiento del anillo de pirrolidina y, por tanto, afectar a la proporción de rotámeros *cis/trans*⁹⁹. Un ligero aumento en el rotámero *trans* se observa en los análogos **43** y **44**, en los que se han sustituido los residuos de L-Pro-L-Glu de GPE por D-Pro-L-Glu y D-Pro-D-Glu. Por último, el cambio de Pro por el anillo de seis miembros Pip (análogo **32**) muestra una población de conformeros parecida a la de GPE, mientras que la introducción del anillo de Aze (análogo **33**) conlleva a un considerable aumento de la proporción del rotámero *cis*.

Tabla 3.6. Relación *cis/trans* observada para los análogos **32-44**.

Nº	Compuesto	<i>cis:trans</i> (%)
1	Gly-Pro-Glu (GPE)	19:81
32	Gly-Pip-Glu	21:79
33	Gly-Aze-Glu	35:65
34	Gly-amp-Glu	22:78
35	Gly-Hyp-Glu	19:81
36	Gly-Oic-Glu	12:88
37	Gly-Ahc-Glu	25:75
38	Gly-dmT-Glu	100:0
39	Gly-P ^{Me} -Glu	11:89
40	Gly-Thz-Glu	33:77
41	Gly-dmP-Glu	69:31
42	Gly-D-dmP-Glu	82:18
43	Gly-D-Pro-Glu	25:75
44	Gly-D-Pro-D-Glu	17:83

3.2.4. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

Se ha evaluado la afinidad por receptores de glutamato (GluRs) de todos los tripéptidos análogos de GPE sintetizados, así como su efecto neuroprotector en cultivos celulares. A efectos comparativos, en estos ensayos se incluyeron también el antagonista competitivo de receptores de NMDA (*R*)-AP5 (ácido (2*R*)-2-amino-5-fosfonopentanoico), y el propio GPE.

La fijación a receptores de glutamato de estos análogos se determinó mediante la medida del desplazamiento de ácido L-[³H]-glutámico de membranas sinápticas de corteza de rata¹¹⁰. Un análisis conjunto de la Tabla 3.7, muestra la influencia de los distintos tipos de restricción conformacional de los sustitutos de prolina en la fijación a GluRs, así como la intolerancia del residuo de glutámico al acortamiento o alargamiento de la cadena lateral, en contraste a la tolerancia del residuo de glicina a cambios por diferentes aminoácidos.

Como se puede observar, al sustituir el residuo de Gly en el GPE por otros aminoácidos, se observa una cierta dependencia de la afinidad en función de la naturaleza de éstos que parece estar relacionada con efectos estéricos. Así la incorporación de Ala, D-Ala y Phe (tripéptidos **14**, **15** y **16**) condujo a afinidades significativas, aproximadamente 10 veces superiores al GPE en los tres casos, mientras que la incorporación de Asp, Lys y Nle (tripéptidos **17**, **18** y **19**), a pesar de poseer cadenas laterales ácida, básica y neutra, respectivamente, mostraron afinidades similares entre sí y similares a las del tripéptido modelo. Por el contrario, la incorporación del aminoácido ramificado Ile en **20** conllevó la pérdida total de afinidad. Esta pérdida se observó también en los derivados procedentes de la *N*-acetilación de la Gly así como de la sustitución por un grupo acetilo de este aminoácido (análogos **21** y **22**), lo que parece indicar la necesidad de que el grupo *N*-terminal de GPE se encuentre libre. Asimismo parece necesario que se encuentre libre el extremo *C*-terminal a la vista de la falta de afinidad de los derivados **28** y **29**.

Tampoco mostraron afinidad observable hasta 100 µM los derivados portadores

Tabla 3.7. Desplazamiento de ácido L-[³H]-glutámico de membranas sinápticas de corteza de rata de los análogos de Gly-Pro-Glu (GPE) modificados en el residuo de glicina (AA₁-Pro-Glu), prolina (Gly-AA₂-Glu) y glutámico (Gly-Pro-AA₃).

Nº	Compuesto	Ki (μM)	Nº	Compuesto	Ki (μM)
1	Gly-Pro-Glu (GPE)	31.24 ± 15.65	30	Gly-Acp-Glu	>100
14	Ala-Pro-Glu	2.66 ± 0.31	31	Gly-Ach-Glu	>100
15	D-Ala-Pro-Glu	5.40 ± 0.75	32	Gly-Pip-Glu	2.39 ± 0.17
16	Phe-Pro-Glu	4.85 ± 1.02	33	Gly-Aze-Glu	>100
17	Asp-Pro-Glu	41.43 ± 6.48	34	Gly-amp-Glu	15.54 ± 4.78
18	Lys-Pro-Glu	22.03 ± 5.48	35	Gly-Hyp-Glu	9.24 ± 1.74
19	Nle-Pro-Glu	19.50 ± 7.64	36	Gly-Oic-Glu	22.37 ± 5.30
20	Ile-Pro-Glu	>100	37	Gly-Ahc-Glu	0.48 ± 0.09
21	Ac-Gly-Pro-Glu	>100	38	Gly-Thz-Glu	>100
22	Ac-Pro-Glu	>100	39	Gly-P ^{Me} -Glu	7.96 ± 1.83
23	Gly-Pro-Asp	>100	40	Gly-dmT-Glu	>100
24	Gly-Pro-D-Asp	>100	41	Gly-dmP-Glu	3.79 ± 0.53
25	Gly-Pro-D-Glu	>100	42	Gly-D-dmP-Glu	0.33 ± 0.07
26	Gly-Pro-Hgl	>100	43	Gly-D-Pro-Glu	>100
27	Gly-Pro-D-Hgl	>100	44	Gly-D-Pro-D-Glu	>100
28	Gly-Pro-Glu-NHMe	>100		(R)-AP5	3.83 ± 1.76
29	Ac-Gly-Pro-Glu-NHMe	>100		L-Glutámico	0.87 ± 0.21

del homólogo inferior (Asp) y superior (Hgl) de glutámico tanto de configuración L como D, **23**, **24**, **26** y **27**, a pesar de que la mayoría de antagonistas competitivos de NMDA descritos poseen las funciones ácidas del grupo carboxilo en α y de la cadena lateral separadas por cuatro o seis eslabones^{111, 112}, con lo que cabía esperar que los derivados de Hgl **26** y **27** mostrasen cierta afinidad al poseer las funciones ácidas separadas por cuatro eslabones. El drástico descenso de la afinidad que tiene lugar al sustituir el residuo de Glu de GPE por D-Glu (compuesto **25**) está de acuerdo con que la interacción del aminoácido libre D-Glu con los receptores NMDA sea mucho menos potente que la de su enantiómero L-Glu, según se indica en la bibliografía¹¹¹⁻¹¹³. Efecto similar se observa al sustituir Pro por D-Pro y Pro-Glu por D-Pro-D-Glu (análogos **43** y **44**) lo que parecería

indicar intolerancia por residuos de configuración D. Sin embargo, el análogo **42**, portador del anillo de D-dmP, ha resultado ser el derivado con mayor afinidad por GluRs de toda la serie. Este incremento tan significativo fue inesperado, teniendo en cuenta la pérdida de afinidad a la fijación de GluRs observada cuando el residuo de Pro de GPE fue reemplazado por D-Pro en **43**.

El impacto de la restricción conformacional en los análogos que incorporan sustitutos del residuo de Pro se refleja de manera diferente en la fijación a GluRs (Tabla 3.7). Así, la incorporación del 7-azabicyclo Ahc en **37**, el segundo mejor ligando de toda la serie, condujo a una afinidad una y dos ordenes de magnitud superior a la del AP5 y GPE, respectivamente, mientras que la afinidad de **36**, portador del bicyclo Oic, fue del mismo orden que la del tripéptido modelo. Sin embargo, el cambio de prolina por sus homólogos superior e inferior condujo a resultados muy diferentes entre sí. Así, mientras la afinidad del derivado de ácido pipecólico **32** fue unas 10 veces superior a la del GPE, el derivado de azetidina **33**, más restringido conformacionalmente que **32**, no mostró afinidad a 100 μ M. Por su parte, ninguno de los análogos **30** y **31** que incorporan los aminoácidos carbocíclicos Acp y Ach mostraron afinidad a concentraciones inferiores a 100 μ M. Por el contrario, los derivados de (2*S*,4*S*)-aminoprolina y (2*S*,4*R*)-hidroxiprolina **34** y **35** mostraron afinidades similares y 2-3 veces mayores que el GPE, al igual que parecidas proporción de rotámeros *cis/trans*. El hecho de que la conformación en torno al enlace Gly-Pro no sea importante para la fijación de esta serie a GluRs, se refleja claramente al comparar los análogos derivados de P^{Me}, **39**, con una población *trans* preferente (11:89), con el análogo de dmP **41**, que principalmente muestra población *cis* (69:31), y observar que ambos poseen unas afinidades muy semejantes. Es interesante destacar que ni el derivado de dmT **38** (100% conformación *cis*), ni el de Thz **40** (23:77 *cis/trans*), fueron capaces de fijarse al receptor NMDA. La presencia de un átomo de azufre, capaz de alterar el plegamiento adoptado por el anillo, y la hidrofobicidad de los residuos de pseudoprolina dmT y Thz en comparación a la prolina, podrían explicar la pérdida de afinidad de los análogos **38** y **40** con respecto a GPE y **41** respectivamente.

En resumen, el análogo de GPE que incorpora D-dmP **42** se ha mostrado el más afín por receptores de glutamato de todos los análogos estudiados en esta serie de

tripéptidos, junto con el derivado de Ahc **37**, siendo la afinidad uno y dos órdenes de magnitud respectivamente, más alta que la de (*R*)-AP5 y GPE (Tabla 3.7).

La actividad neuroprotectora fue determinada en cultivos neuronales primarios de hipocampo de rata, mediante la medida del porcentaje de protección sobre el efecto neurotóxico producido por exposición a NMDA 100 μ M y por privación de oxígeno y glucosa (OGD), respectivamente, de acuerdo con los protocolos descritos para cada ensayo^{114, 115}. Los compuestos fueron ensayados a concentraciones de 10 y 100 μ M.

Como se muestra en la Figura 3.14, el efecto neuroprotector en el ensayo de exposición a NMDA de todos los análogos **14-44** fue similar o menor que el de GPE. Al comparar la actividad neuroprotectora frente a NMDA con la afinidad por receptores de glutamato mostrada anteriormente (Tabla 3.7), se observa claramente que no existe correlación entre ambos ensayos, como se puede ver en el caso del análogo de D-dmP **42** que posee la mayor afinidad por receptores de glutamato de la serie pero que, en cambio, muestra una muy escasa actividad neuroprotectora a 100 μ M y ninguna a 10 μ M. El caso contrario ocurre con los derivados de tiazolidina **38** y **40**, o los análogos portadores de aminoácidos de configuración D **25** y **43**, los cuales no muestran afinidad detectable por GluRs pero si muestran un efecto neuroprotector frente a excitotoxicidad por NMDA considerable, siendo **25** y **43** los análogos más potentes con una actividad similar o incluso muy superior a GPE tanto a 10 como a 100 μ M.

La citada falta de correlación parece indicar que, al margen de la afinidad por receptores de glutamato, existen otros mecanismos adicionales responsables, en mayor o menor medida, de la neuroprotección provocada por el GPE en este ensayo en cultivos neuronales.

Los análogos con mayor efecto protector frente a neurotoxicidad inducida por NMDA **22**, **25**, **29**, **38-44**, fueron también evaluados en cultivos neuronales sometidos a condiciones de OGD. Como se puede observar en la Figura 3.15, todos ellos mostraron efecto neuroprotector en mayor o menor medida, excepto el análogo portador de D-dmP **42** que si bien a 10 μ M fue el más potente, a 100 μ M, sorprendentemente y como único

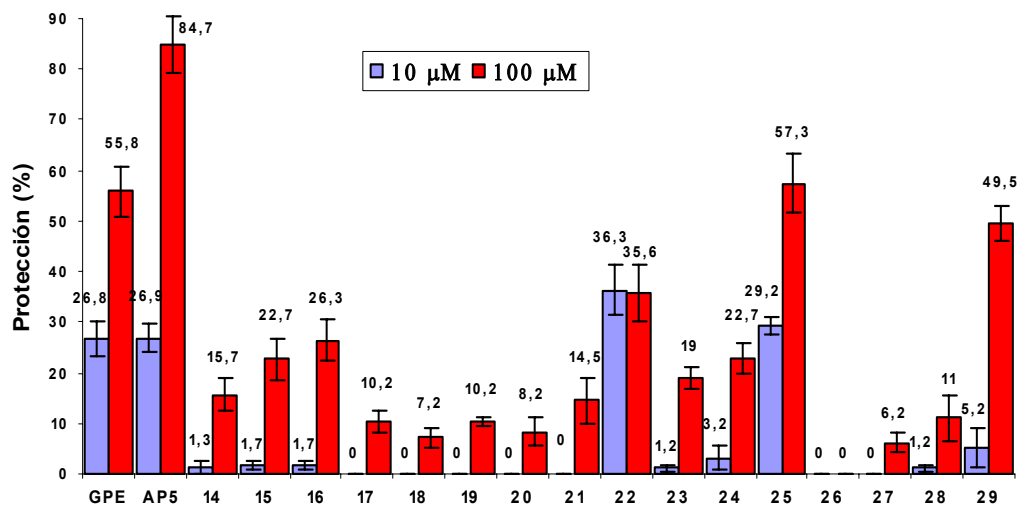


Figura 3.14.

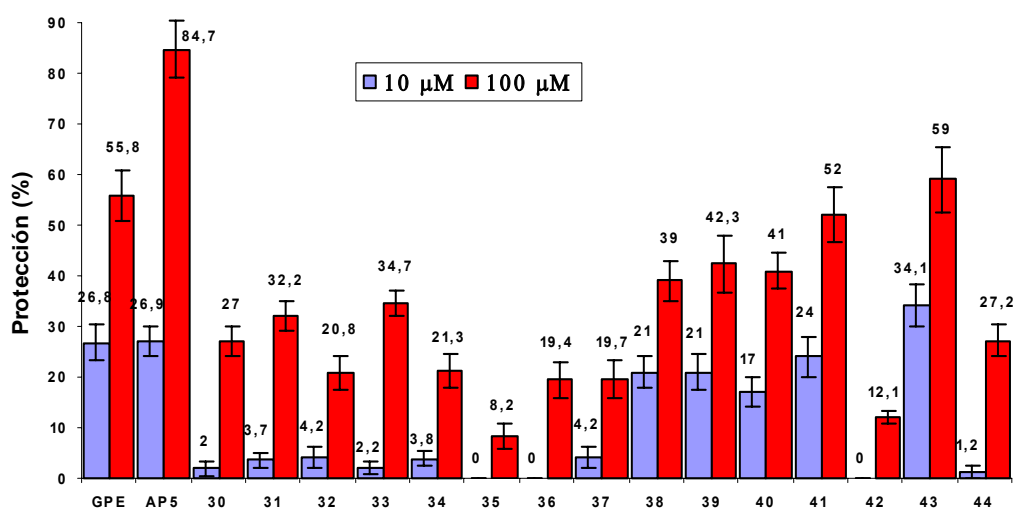


Figura 3.14 (Continuación). Porcentaje de protección de cultivos neuronales de hipocampo de rata a excitotoxicidad inducida por NMDA (100 µM). La supervivencia celular se determinó por medida de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre el derivado de tetrazolio MTT. Los valores indicados representan el valor medio \pm la desviación estándar de 8-13 experimentos.

caso de esta serie, perdió totalmente su efecto. Además de **42**, merecen destacarse por su notable efecto neuroprotector, particularmente a 100 μ M, el derivado *N* y *C*-terminal sustituido **29** y los análogos que incorporan uno o dos aminoácidos de configuración *D*, **43** y **44**, respectivamente, todos ellos con potencia similar o superior a la de GPE a 10 μ M y 100 μ M.

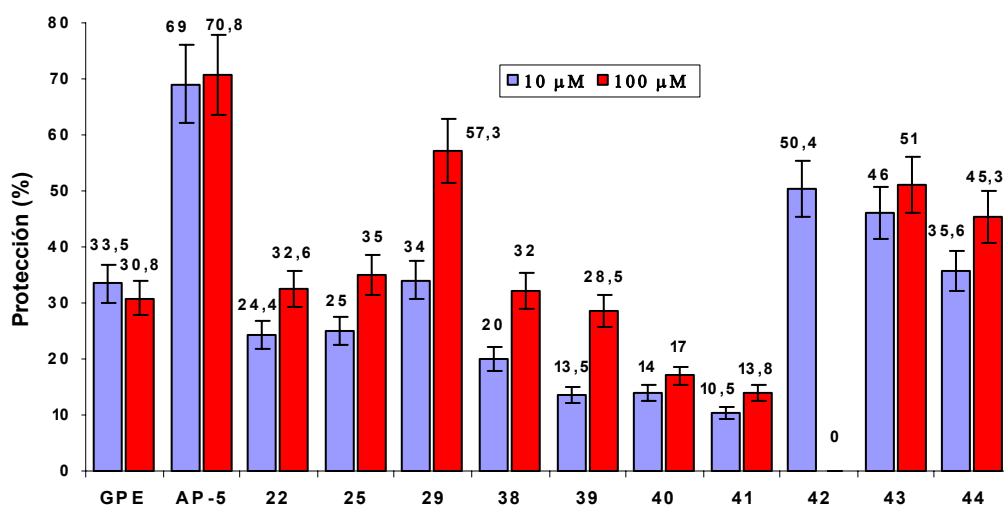


Figura 3.15. Porcentaje de protección de cultivos neuronales de hipocampo de rata a daño inducido por privación de oxígeno y glucosa. La supervivencia celular se determinó por medida de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre el derivado de tetrazolio MTT. Los valores indicados representan el valor medio \pm la desviación estándar de 8-13 experimentos.

Un análisis conjunto del efecto neuroprotector en ambos ensayos de cultivos celulares de los tripéptidos análogos de GPE, incluidos en este capítulo, parece apuntar hacia que la incorporación de *D*-Pro y/o *D*-Glu en GPE conduce a efectos neuroprotectores considerables, similares o superiores a los de este tripéptido endógeno. La ventaja que cabe esperar de Gly-Pro-*D*-Glu (**25**), Gly-*D*-Pro-Glu (**43**) y Gly-*D*-Pro-*D*-Glu (**44**) es su mayor estabilidad frente a las peptidasas responsables de la ruptura del enlace Pro-Glu que parecer ser causa de su rápida degradación metabólica.

3.3. PSEUDOTRIPÉPTIDOS ANÁLOGOS DE GPE

Siguiendo la estrategia encaminada hacia el diseño de peptidomiméticos a partir de la estructura del péptido nativo, indicada en la introducción general, nuestra siguiente etapa consistió en la preparación de pseudopéptidos análogos de GPE. Para ello, seleccionamos los grupos CH_2NH y $\text{CH}(\text{CN})\text{NH}$ como sustitutos de los correspondientes enlaces peptídicos de este tripéptido. Dentro de las modificaciones del enlace peptídico, el enlace peptídico reducido $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ o metilenamino, continúa siendo una de las más utilizadas, posiblemente por la sencillez de la metodología sintética requerida para su incorporación, consistente en una aminación reductiva, pero también por los buenos resultados a los que ha conducido en la búsqueda tanto de agonistas o antagonistas de diversos péptidos¹¹⁶, como de inhibidores de peptidasas de interés terapéutico^{117, 118}. Sin embargo, esta modificación conlleva un aumento en la flexibilidad del esqueleto peptídico y una disminución importante en la capacidad de formación de puentes de hidrógeno, por pérdida del carbonilo de la carboxamida, aceptor de enlaces de hidrógeno^{119, 120}. Teniendo en cuenta estos hechos, a principios de los años noventa nuestro grupo de investigación propuso el agrupamiento cianometilenamino $\text{CH}(\text{CN})\text{NH}$ como mejor mimético del enlace peptídico que el $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ ¹²¹, y desarrolló una metodología para la preparación de pseudopéptidos $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ basada en una síntesis modificada de la reacción de Strecker¹²². La propuesta del enlace cianometilenamino $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ como mejor sustituto del enlace peptídico que la

agrupación $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ se basó en los resultados de un estudio de cálculos semiempíricos realizados sobre modelos simplificados de ambos grupos¹²¹, que muestran que el grupo ciano mantiene parte del carácter aceptor de enlaces de hidrógeno del carbonilo del enlace peptídico $[\text{CONH}]$. Además, la presencia del grupo CN en este nuevo sustituto del enlace peptídico contrarrestaría, en parte, el aumento de flexibilidad que conlleva el cambio de geometría plana a tetraédrica al pasar de hibridación sp^2 a sp^3 , como ocurre en el enlace $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$. Posteriormente, los resultados biológicos de análogos de neurotensina¹²³ y de CCK¹²⁴, así como de antagonistas de receptores CCK_I¹²⁵, que incorporan este enlace pseudopeptídico confirmaron al enlace cianometilenamino como buen mimético del enlace peptídico. Es de tener en cuenta que la distinta quiralidad del nuevo centro asimétrico del agrupamiento $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ puede afectar a los efectos farmacológicos del pseudopéptido en cuestión, como de hecho se ha demostrado con la afinidad y funcionalidad agonista/antagonista de una serie de ligandos de receptores CCK¹²⁵. Otra ventaja a señalar en el caso de los pseudopéptidos $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$, derivada de la reactividad tanto del grupo ciano como de los grupos reactivos aportados por los residuos de aminoácidos, es su gran versatilidad como intermedios para reacciones de ciclación pudiendo dar lugar a esqueletos conformacionalmente restringidos de interés en el diseño general de peptidomiméticos, como indicaremos, en nuestro caso, en el Apartado 3.5. Por último, señalar que tanto el enlace peptídico reducido como el cianometilenamino aportan un grupo NH básico e ionizable, que presenta la ventaja de protonarse a un pH fisiológico, aumentando la solubilidad en agua y facilitando con ello la administración de los correspondientes pseudopéptidos¹¹⁹.

Por tanto, a la vista de las razones expuestas, nos propusimos introducir en el tripéptido GPE, los grupos $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ y $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ como sustitutos del enlace peptídico tanto entre Gly-Pro como entre Pro-Glu. Los pseudotripéptidos que nos propusimos sintetizar con la esperanza de aumentar la resistencia a degradación por peptidasas, mantener o mejorar el efecto neuroprotector de GPE, y establecer relaciones estructura-actividad se encuentran representados en la Figura 3.16.

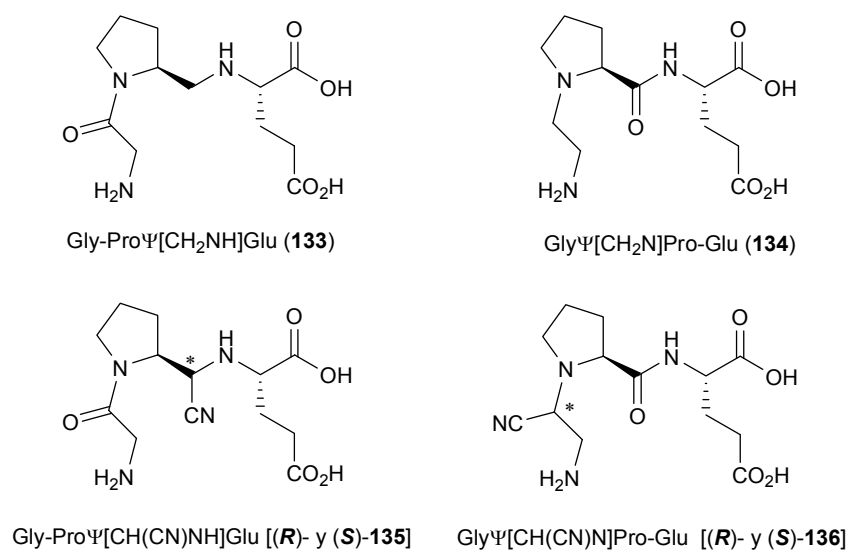
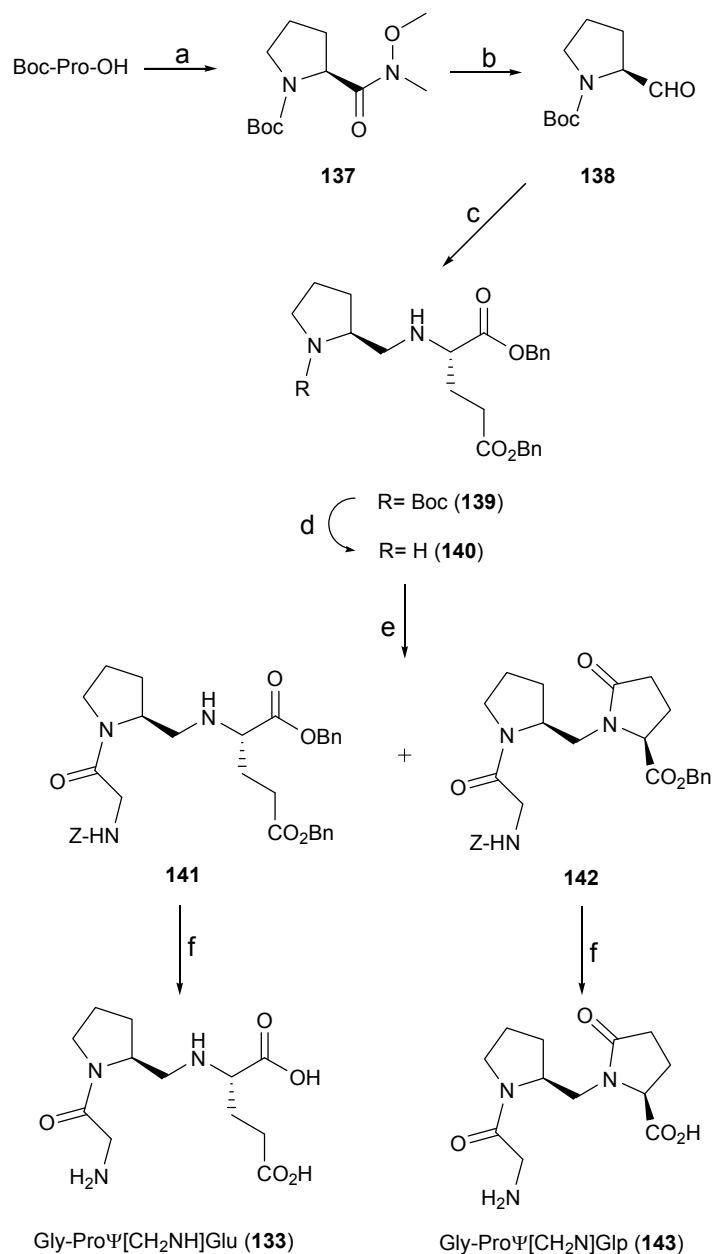


Figura 3.16. Pseudotripéptidos derivados de GPE propuestos.

3.3.1. PSEUDOTRIPÉPTIDOS METILENAMINO Ψ [CH₂NH]

La estrategia de formación del enlace peptídico reducido Ψ [CH₂NH] implica una reacción de aminación reductiva entre α -aminoaldehídos *N*-protegidos con derivados de α -aminoácidos *N*-desprotegidos, en presencia del agente reductor y de un ácido de Lewis¹²⁶. Así, para abordar la síntesis del pseudotripéptido **133**, se hizo reaccionar Boc-prolinal (**138**), previamente sintetizado por el método de Fehrentz-Castro¹²⁷ mediante reducción de la *N*-metoxi-*N*-metilcarboxamida correspondiente, con H-Glu(OBn)-OBn·HCl, en presencia de ZnCl₂ y NaBH₃CN como agente reductor, dando lugar al correspondiente pseudodipéptido protegido **139** con un rendimiento del 65% (Esquema 3.14). En este caso, la *N*-Boc desprotección de **139**, seguida de reacción con Z-Gly-OH condujo a una mezcla compuesta por el pseudotripéptido metilenamino protegido **141** y el derivado **142**, proveniente de la lactamización del residuo de glutámico. La proporción obtenida de estos compuestos en las condiciones de reacción utilizadas (18 horas, t.a.) fue

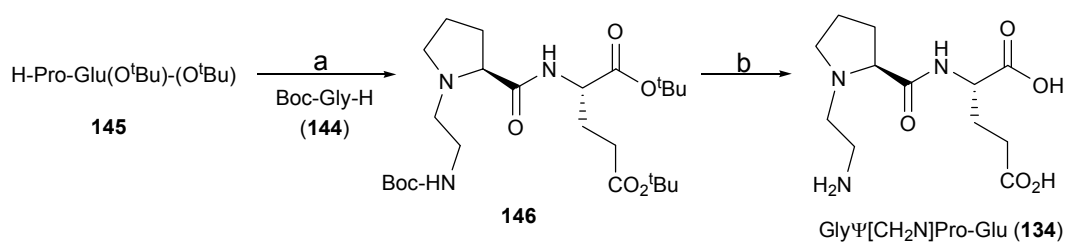
de 46:54 a favor del derivado de piroglutámico **142**. La hidrogenación catalítica de ambos pseudotripéptidos condujo a la obtención de los análogos desprotegidos de GPE **133** y **143** de manera cuantitativa (Esquema 3.14).



a) HN(OMe)Me·HCl, BOP, Et₃N; b) LiAlH₄, THF, Ar; c) H-Glu(OBn)-OBn·HCl, NaBH₃CN, ZnCl₂, Et₃N, tamiz 4Å, CH₂Cl₂; d) HCl/AcOEt; e) Z-Gly-OH, BOP, DIEA; f) H₂, Pd (C).

Esquema 3.14.

Para la obtención de Gly Ψ [CH₂N]Pro-Glu (**134**) se siguió una estrategia similar de aminación reductiva, esta vez entre Boc-glicinal, sintetizado previamente por el método de Fehrentz-Castro, y el dipéptido H-Pro-Glu(O^tBu)-(O^tBu) (**145**), sintetizado por acoplamiento entre Z-Pro-OH y H-Glu(O^tBu)-(O^tBu) y posterior eliminación del grupo Z. La condensación de ambos en presencia de ZnCl₂ y NaBH₃CN dio como resultado el pseudopéptido protegido **146** con un rendimiento moderado del 37% (Esquema 3.15). Este descenso de rendimiento en comparación con la reacción de formación del pseudodipéptido Pro Ψ [CH₂NH]Glu (**139**) podría deberse a la baja estabilidad del Boc-Gly-H. Este hecho queda reflejado al recuperarse en la reacción un 54% del dipéptido de partida **145** y no detectar la presencia de Boc-Gly-H. Posterior tratamiento de **146** con TFA condujo a su completa desprotección obteniéndose el análogo de GPE **134** de manera cuantitativa.



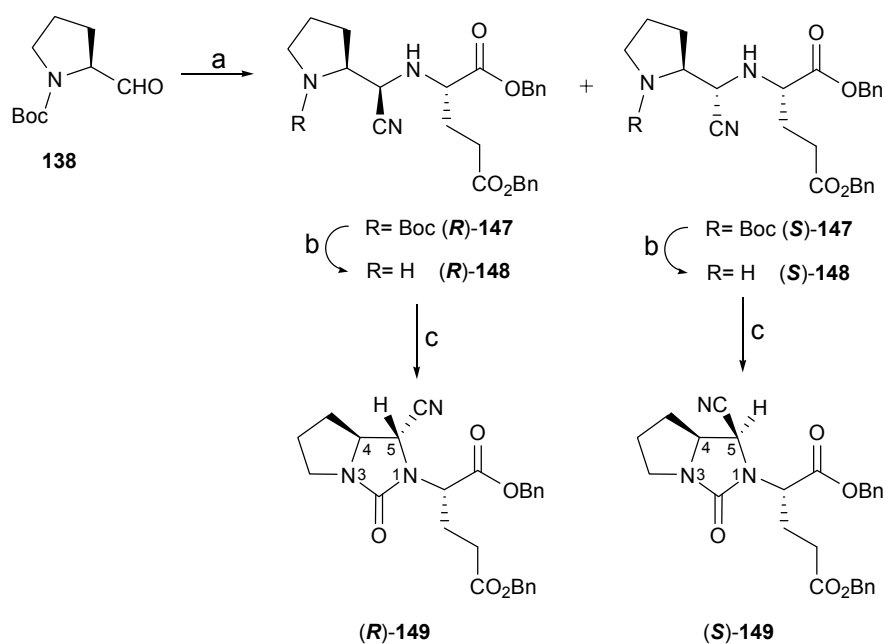
a) NaBH₃CN, ZnCl₂, tamiz 4Å, CH₂Cl₂; b) TFA, CH₂Cl₂.

Esquema 3.15.

3.3.2. PSEUDOTRIPÉPTIDOS CIANOMETILENAMINO Ψ [CH(CN)NH]

La formación del enlace pseudopeptídico Ψ [CH(CN)NH] en todos estos nuevos pseudopéptidos se llevó a cabo aplicando la metodología previamente desarrollada en nuestro laboratorio, consistente en la reacción de un α -aminoaldehído *N*-protegido con un aminoácido o péptido *N*-desprotegido, seguida de adición de CNTMS, catalizada por

ZnCl₂, a la correspondiente imina formada *in situ*¹²². En esta reacción se genera un nuevo centro estereogénico en el enlace Ψ[CH(CN)NH], siendo la estereoselectividad del proceso dependiente, fundamentalmente, de la naturaleza y estereoquímica del α-aminoaldehído y del aminoácido de partida¹²². En nuestro caso, al hacer reaccionar Boc-Pro-H (**138**) con el clorhidrato de H-Glu(OBn)-OBn, en presencia de ZnCl₂, y posterior adición de CNTMS a -20 °C, se obtuvieron los pseudodipéptidos (*R*)- y (*S*)-**147** con un rendimiento total del 79%, en una proporción *R:S* de 58:42 (Esquema 3.16). Estas proporciones se determinaron por ¹H-RMN del bruto de reacción una vez reconocidas las señales de cada uno de los diastereoisómeros, que pudieron ser separados cromatográficamente y asignados como se verá a continuación.



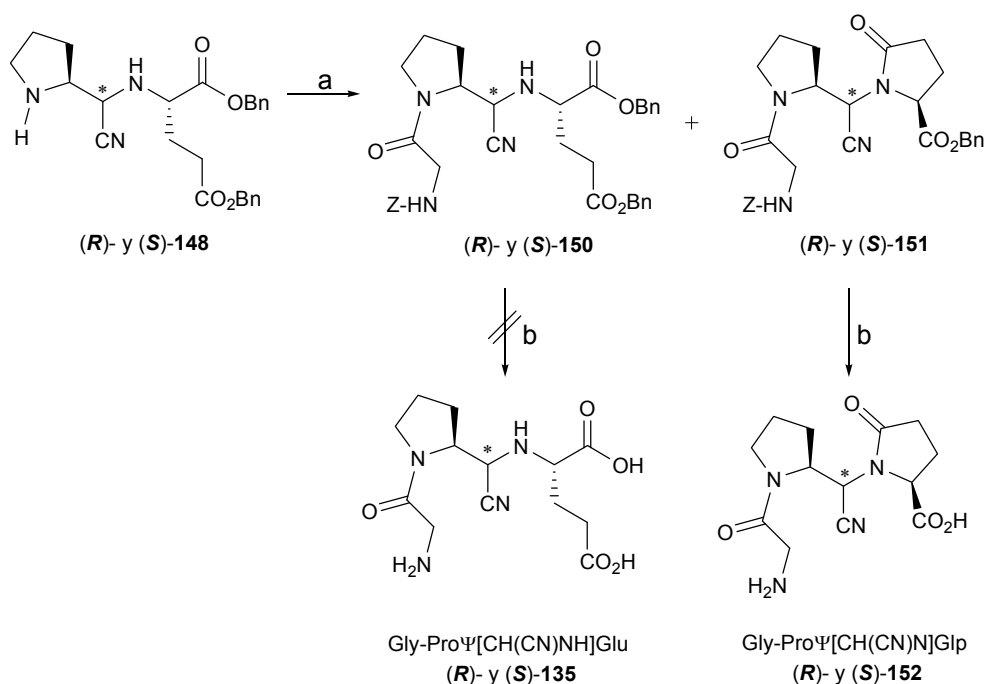
a) H-Glu(OBn)-OBn·HCl, CNTMS, ZnCl₂, Et₃N, CH₂Cl₂; b) HCl/AcOEt; c) (Cl₃CO)₂CO, Et₃N.

Esquema 3.16.

La configuración absoluta del nuevo centro quiral se determinó en base al valor de la constante de acoplamiento ³J_{4,5} en el espectro de ¹H-RMN de las 2-oxoimidazolidinas (*R*)- y (*S*)-**149** obtenidas a partir de los correspondientes pseudopéptidos desprotegidos (*R*)- y (*S*)-**148** mediante tratamiento con carbonato de

bis(triclorometilo)¹²⁸ (Esquema 3.16). Así, la 2-oxoimidazolidina (**R**)-**149** mostró una constante de acoplamiento $^3J_{4,5} = 2.4$ Hz, característica de una disposición *trans* para los protones 4-H, 5-H, mientras que en la 2-oxoimidazolidina (**S**)-**149** el valor de esta constante fue de 8.5 Hz, característica de una disposición *cis* para dichos protones^{129, 130}. Esta asignación se confirmó mediante experimentos NOE en las 2-oxoimidazolidinas.

El acoplamiento de (**R**)- y (**S**)-**148** con Z-Gly-OH utilizando BOP como agente de acoplamiento durante 18 h y a t.a., condujo en cada caso, además de a los pseudotripéptidos correspondientes (**R**)- y (**S**)-**150** (22 y 29% respectivamente), a un alto porcentaje del producto resultante de la ciclación de la cadena lateral del glutámico, formándose los derivados de piroglutámico correspondientes (**R**)- y (**S**)-**151** con un rendimiento del 68 y 64% respectivamente (Esquema 3.17). Con el fin de minimizar la lactamización del residuo de glutámico, se llevó a cabo la reacción durante 2.5 h y 0 °C.



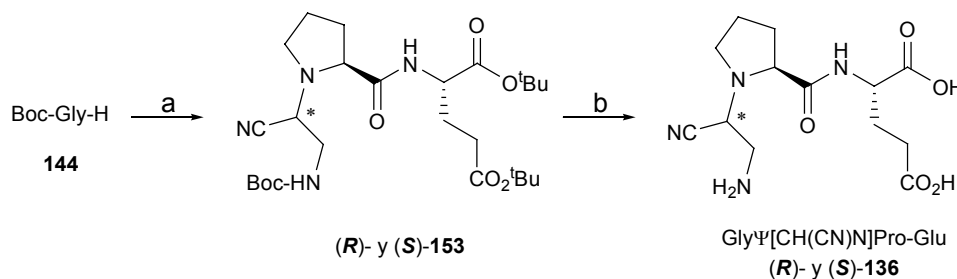
a) Z-Gly-OH, BOP, DIEA, 0 °C; b) H₂, Pd (C).

Esquema 3.17.

Sin embargo, a pesar de observarse un descenso significativo en la TLC del bruto de reacción, tras la purificación por cromatografía en columna se obtuvieron unos porcentajes similares. Estos cuatro pseudotripéptidos fueron hidrogenados para eliminar los grupos protectores. Mientras que la hidrogenación de los derivados de piroglutámico (**R**)- y (**S**)-**151** transcurrió de manera cuantitativa obteniéndose (**R**)- y (**S**)-**152**, la reacción de hidrogenación de (**R**)- y (**S**)-**150** condujo, en ambos casos, a una mezcla compleja en la que pudo detectarse los correspondientes análogos desprotegidos (**R**)- y (**S**)-**135** por espectrometría de masas. Sin embargo, los intentos de purificación de estos derivados desprotegidos mediante cromatografía en fase reversa o cristalización fueron infructuosos, dando lugar a la ruptura del enlace cianometilenamino. Idénticos resultados negativos se obtuvieron al cambiar las condiciones de reacción de hidrogenólisis, acortando o alargando tiempos de reacción, variando la proporción del catalizador, cambiando el Pd(C) por Ni Raney, o añadiendo un equivalente de AcOH al medio.

La síntesis de GlyΨ[CH(CN)N]Pro-Glu (**136**) se abordó siguiendo la misma metodología mediante reacción modificada de Strecker pero acoplando, en este caso, un dipéptido al aminoaldehído en lugar de un aminoácido. Así, la condensación de Boc-Gly-H (**144**) con H-Pro-Glu(O^tBu)-(O^tBu) (**145**) en presencia de ZnCl₂, y posterior adición de CNTMS, a -20 °C, condujo a los pseudotripéptidos protegidos (**R,S**)-**153** con un rendimiento total del 32%, en una proporción 59:41 (Esquema 3.18), recuperándose un 64% del dipéptido de partida **145**. Esta mezcla epimérica pudo ser separada por cromatografía en columna, pero no fue posible la asignación de la configuración absoluta de cada uno de ellos por NOE, ni mediante la formación de 2-oxoimidazolidinas dada su estructura. Finalmente, al tratar cada uno de estos diastereoisómeros con TFA durante 24 horas se obtuvieron de manera cuantitativa los pseudotripéptidos desprotegidos (**R**)- y (**S**)-**136**, que pudieron caracterizarse a pesar de ser inestables y degradarse rápidamente con el transcurso del tiempo. La configuración del nuevo centro asimétrico de (**R**)-, (**S**)-**136** y (**R**)-, (**S**)-**153** se realizó, tentativamente, por comparación con Boc-GlyΨ[CH(CN)N]Pro-OMe [(**R**)- y (**S**)-**181**] y H-GlyΨ[CH(CN)N]Pro-OMe [(**R**)- y (**S**)-**182**], en base a la diferencia de δ observada entre ambos tipos de diastereoisómeros en los espectros de ¹³C-RMN. Así, al contrastar las parejas de diastereoisómeros, en todos los

casos se observó para los epímeros (*R*) un desplazamiento a campo más bajo en el δ del C_α de la prolina y a campo más alto para el C_δ del mismo residuo, respecto a los epímeros (*S*) (ver Tablas 5.15 y 5.16). Las parejas (*R*)- y (*S*)-**181** y (*R*)- y (*S*)-**182**, se asignaron inequívocamente como se indicará en el Apartado 3.5.2.



a) H-Pro-Glu(O^tBu)-O^tBu, CNTMS, ZnCl₂, CH₂Cl₂; b) TFA, CH₂Cl₂.

Esquema 3.18.

3.3.3. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

De manera similar a los péptidos descritos en el capítulo anterior, se ha evaluado la afinidad por GluRs y la actividad neuroprotectora en cultivos celulares de los pseudopéptidos **133**, **134**, **143**, y (*R*)- y (*S*)-**152** sintetizados. A efectos comparativos, se ha incluido GPE en estos ensayos. No se incluyeron en este estudio los análogos GlyΨ[CH(CN)N]Pro-Glu [(*R*)- y (*S*)-**136**] ya que no pudieron ser ensayados debido a su baja estabilidad.

Como se puede observar en la Tabla 3.8, en la que se indican los valores de afinidad por GluRs, existe una intolerancia a los cambios de los dos enlaces peptídicos de GPE por el agrupamiento [CH₂NH], no observándose fijación alguna a GluRs a concentraciones inferiores a 100 μM. Por el contrario, los pseudotripeptidos portadores del Ψ[CH(CN)N] (*R*)- y (*S*)-**152** mostraron, respectivamente, una afinidad más de 40 veces superior y similar a la de GPE. Aunque en el caso de estos pseudopéptidos no

disponemos de los análogos derivados de Glu sin lactamizar, que nos permitirían determinar la influencia en la afinidad de la sustitución del enlace peptídico Pro-Glu por (*R*) o (*S*) CH(CN)NH, sí que podemos comparar (*R*)- y (*S*)-**152** con el análogo Ψ[CH₂N], **143**, y afirmar, una vez más, que el grupo CH(CN)NH es mejor sustituto del enlace peptídico que el CH₂NH¹²¹⁻¹²⁵.

Tabla 3.8. Desplazamiento de ácido L-[³H]-glutámico de membranas sinápticas de corteza de rata de los pseudopéptidos análogos de Gly-Pro-Glu (GPE).

Nº	Compuesto	Ki (μM)
1	Gly-Pro-Glu (GPE)	31.24 ± 15.65
133	Gly-ProΨ[CH ₂ NH]Glu	>100
134	GlyΨ[CH ₂ N]Pro-Glu	>100
143	Gly-ProΨ[CH ₂ N]Glp	>100
(R)-152	Gly-ProΨ[(<i>R</i>)CH(CN)N]Glp	0.70 ± 0.13
(S)-152	Gly-ProΨ[(<i>S</i>)CH(CN)N]Glp	41.05 ± 1.12

En cuanto a ensayos en cultivos celulares expuestos a NMDA, todos estos pseudotripéptidos fueron evaluados (excepto (*S*)-**152**) y mostraron un modesto efecto neuroprotector a 100 μM que desapareció, o prácticamente desapareció a 10 μM y, en cualquier caso, fue menor que el de GPE (Figura 3.17). Al comparar los valores del pseudopéptido (*R*)-**152** y de GPE indicado en la Tabla 3.8 y en la Figura 3.17, se observa nuevamente, que no existe correlación entre la afinidad por GluRs y la prevención de muerte neuronal inducida por NMDA.

Estos pseudotripéptidos también fueron evaluados en cultivos neuronales sometidos a privación de oxígeno y glucosa. Como se puede observar en la Figura 3.18.A, todos ellos, excepto (*S*)-**152**, mostraron un efecto neuroprotector similar o superior a GPE a 10 y 100 μM, lo que indica que los cambios introducidos en el enlace peptídico de GPE son favorables en este tipo de ensayo. Cabe destacar el pseudopéptido GlyΨ[CH₂N]Pro-Glu (**134**) que muestra una potente actividad neuroprotectora a 100 μM, siendo la más alta para este tipo de ensayo de todos los análogos recogidos en esta

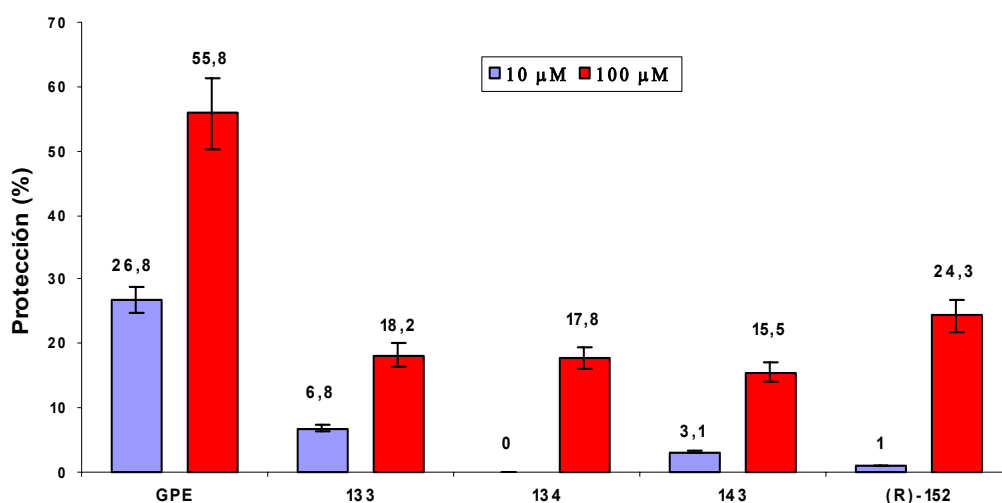


Figura 3.17. Porcentaje de protección de cultivos neuronales de hipocampo de rata a excitotoxicidad inducida por NMDA (100 μM). La supervivencia celular se determinó por medida de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre el derivado de tetrazolio MTT. Los valores indicados representan el valor medio \pm la desviación estándar de 8-13 experimentos.

memoria e incluso ligeramente superior a la de AP-5 a esta concentración (Figura 3.18). Los análogos con mayor efecto neuroprotector a 100 μM [**134** y (*R*)-**152**] así como GPE, se ensayaron a concentraciones inferiores a 10 μM (Figura 3.18.B). A diferencia de GPE, ambos pseudopéptidos mostraron a 1 μM un efecto neuroprotector muy significativo, similar al que mostraron a 10 μM y mayor o del mismo orden que GPE a 10 y 100 μM . También es de señalar el significativo porcentaje de neuroprotección provocado, en este ensayo, por el compuesto **134**, incluso a 0.1 μM .

Referente a la lactamización del residuo de Glu, al comparar la actividad de **133** con la de **143**, se observa que no parece influir significativamente en ninguno de los ensayos efectuados en cultivos celulares. Por otra parte, el efecto de la quiralidad del enlace pseudopeptídico $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ queda reflejado al contrastar los resultados entre (*R*)- y (*S*)-**152**, tanto en este ensayo como en el de afinidad por GluRs. Es de señalar que la diferencia de actividades entre pseudopéptidos portadores del enlace $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ con diferente estereoquímica ya había sido observada anteriormente en nuestro grupo de

investigación^{124, 125}. Por último, a diferencia de lo observado en el ensayo de afinidad, la incorporación del enlace $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ o $\Psi[(R)\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ produce efectos neuroprotectores similares en cultivos (comparar **143** con **(R)-152**).

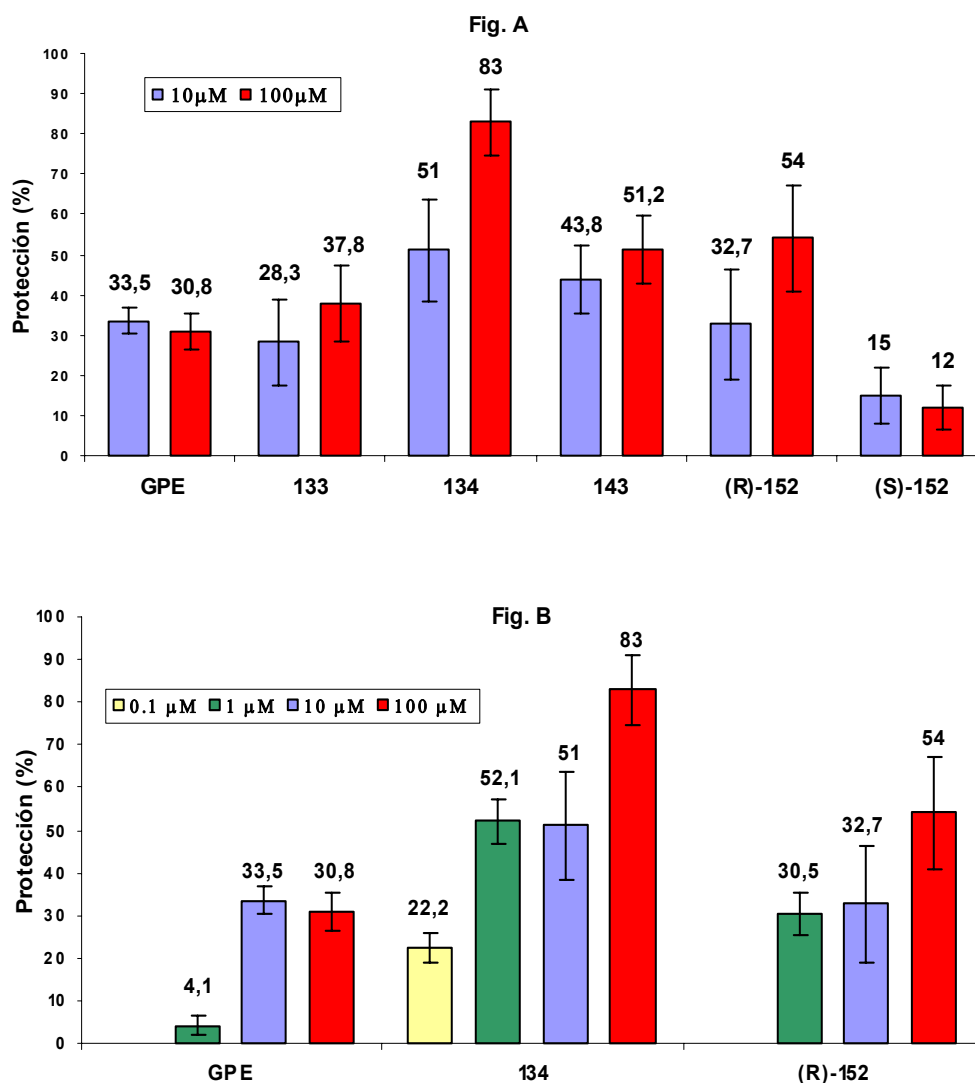
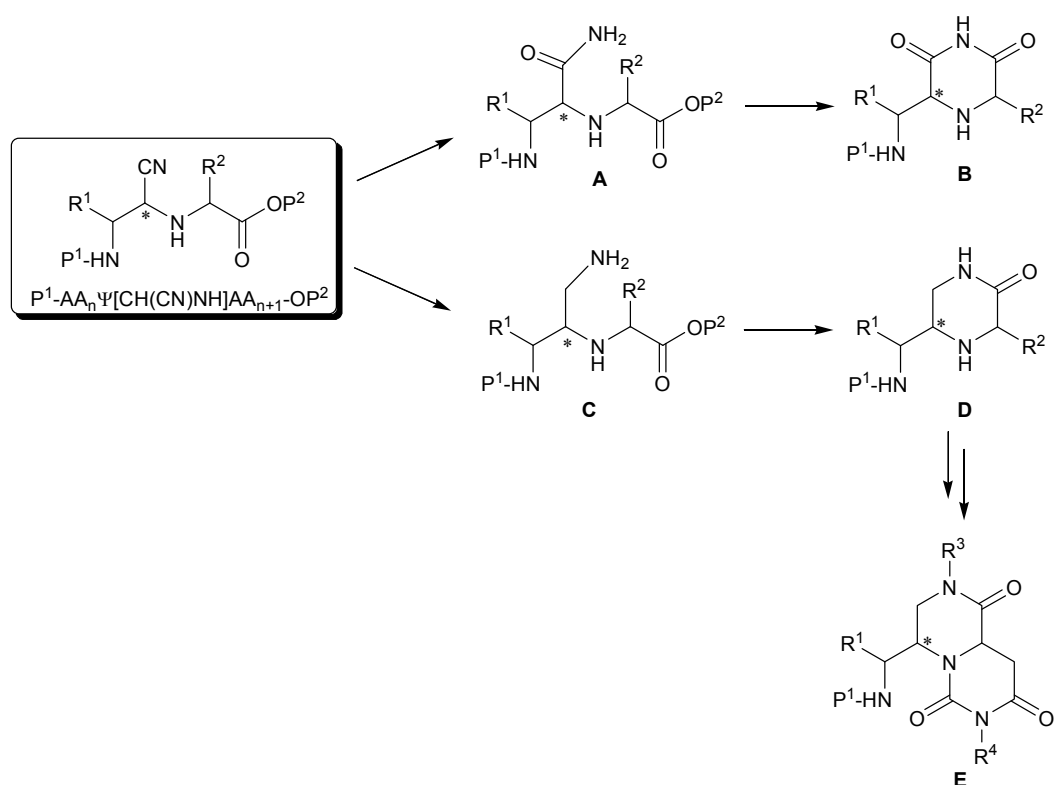


Figura 3.18. Porcentaje de protección a 10 y 100 μM (Fig. A) y 0.1, 1, 10 y 100 μM (Fig. B) de cultivos neuronales de hipocampo de rata a daño inducido por privación de oxígeno y glucosa. La supervivencia celular se determinó por medida de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre el derivado de tetrazolio MTT. Los valores indicados representan el valor medio \pm la desviación estándar de 8-13 experimentos.

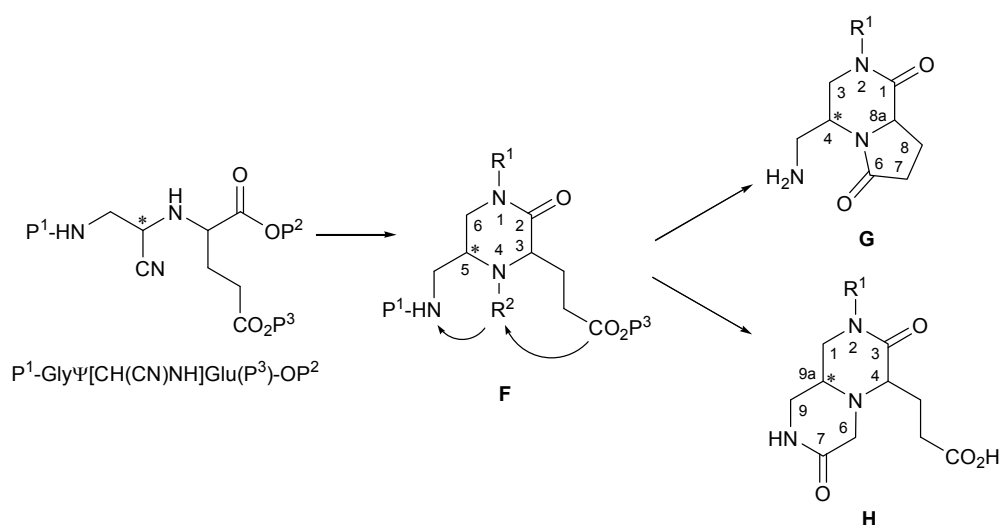
3.4. APLICACIÓN DE PSEUDODIPÉPTIDOS DERIVADOS DE GlyΨ[CH(CN)NH]Glu A LA SÍNTESIS DE OXOPIPERAZINAS Y DERIVADOS BICÍCLICOS

La versatilidad química que proporciona el grupo ciano presente en los α -aminonitrilos, fácilmente transformable en otros grupos funcionales, se ha utilizado para explorar la utilidad de pseudopéptidos cianomentilenamino como intermedios tanto para la obtención de otros pseudopéptidos Ψ relacionados, como para la construcción de esqueletos heterocíclicos privilegiados, de frecuente aparición en la estructura de diversos fármacos. Así, por ejemplo, como se observa en el Esquema 3.19, la hidratación oxidativa del grupo ciano ha dado lugar a pseudopéptidos (carbamoil)metilenamino $\Psi[\text{CH}(\text{CONH}_2)\text{NH}]$ **A**¹³¹, los cuales han conducido a análogos conformacionalmente restringidos de interés en el campo de los peptidomiméticos, tales como derivados de 2,6-dioxopiperazinas **B**¹³¹. Por otro lado, la hidrogenación catalítica del grupo ciano deriva hacia las correspondientes aminas primarias $\Psi[\text{CH}(\text{CH}_2\text{NH}_2)\text{NH}]$ **C**¹³², que han conducido a análogos conformacionalmente restringidos entre los que destacan los derivados de 2-oxopiperazinas **D**, capaces de actuar como miméticos de giros γ de la estructura secundaria peptídica^{48f}, y susceptibles de transformarse en los esqueletos de 1,6,8-trioxoperhidropirazino[1,2-*c*]pirimidinas **E**¹³³.



Esquema 3.19. Síntesis de derivados heterocíclicos a partir de pseudopéptidos $\Psi[CH(CN)NH]$.

Teniendo en cuenta el particular interés que presentan tanto el esqueleto de 2-oxopiperazina, presente en el diseño de diversos compuestos con actividad farmacológica, como los diversos biciclos derivados de 2-oxopiperazinas, enfocamos el interés de esta memoria hacia la síntesis de 2-oxopiperazinas (**F**) a partir del pseudodipéptido Gly $\Psi[CH(CN)NH]$ Glu. Como se observa en el Esquema 3.20, estas oxopiperazinas **F** son portadoras de un residuo de cada uno de estos aminoácidos, por lo que se pueden considerar como posibles miméticos no peptídicos de GPE, y además, son susceptibles de sufrir una serie de transformaciones conducentes a análogos bicíclicos. Así, dada la estructura de la cadena lateral del glutámico, es posible la formación de los derivados de 1,6-dioxoperhidropirrol[1,2-*a*]pirazinas (**G**) mediante una simple reacción de lactamización. Asimismo, la *N*-carboximetilación de la 2-oxopiperazina **F** en posición 4 permitiría una posterior lactamización que conduciría a la obtención de 3,7-dioxoperhidropirazino[1,2-*a*]pirazinas (**H**). Adicionalmente, existe la posibilidad de



Esquema 3.20. Síntesis de 2-oxopiperazinas, 1,6-dioxoperhidropirrolo[1,2-*a*]pirazinas y 3,7-dioxoperhidropirrazino[1,2-*a*]pirazinas a partir de GlyΨ[CH(CN)NH]Glu.

incorporar sustituyentes adecuados en el anillo de oxopiperazina tanto en la estructura monocíclica como en los biciclos a través del nitrógeno lactámico o amínico.

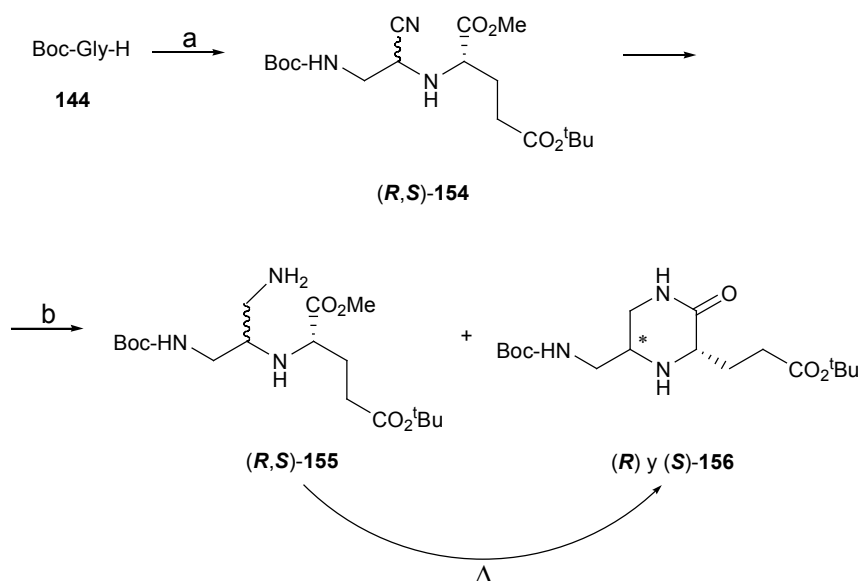
En resumen, a la vista de que piperazinas y oxopiperazinas son consideradas como esqueletos privilegiados en el ámbito químico-médico, en este apartado nos hemos planteado, como aproximación hacia la obtención de miméticos del tripéptido GPE, la utilización de derivados de GlyΨ[CH(CN)NH]Glu como productos de partida para la preparación de 2-oxopiperazinas y de sus derivados bicíclicos 1,6-dioxoperhidropirrolo[1,2-*a*]pirazinas y 3,7-dioxoperhidropirrazino[1,2-*a*]pirazinas como esqueletos quirales con topología definida, portadores de residuos de glicina y glutámico. En la selección de estos biciclos se tuvo también en cuenta su novedad desde el punto vista estructural. Así, se encuentran descritas la síntesis de 3-oxo-¹³⁴ y 4-oxo-¹³⁵ así como las 1,4-dioxoperhidropirrazino[1,2-*a*]pirazinas¹³⁶, pero no lo están, al menos en nuestro conocimiento la de los 3,7-dioxo derivados. Respecto a las perhidropirrolo[1,2-*a*]pirazinas, ya hemos destacado la elevada repercusión de los 1,4-dioxo derivados en el Apartado 1.3 y, ahora indicar que, aunque escasos, existen descritos ejemplos para la preparación de 1-¹³⁷, 4¹³⁸- y 6-oxo¹³⁹ así como de 3,6-dioxo¹⁴⁰. Sin embargo, no hemos

encontrado descritos 1,6-dioxo derivados de este heterociclo bicíclico que, en nuestro caso particular, muestra el aliciente adicional de su relación con el biciclo del unifiram (**13**) que, como se representó en la Figura 1.8, es una 6-oxoperhidropirrol[1,2-*a*]pirazina.

3.4.1. SÍNTESIS

Para abordar la síntesis de las 2-oxopiperazinas **156** se sintetizó previamente el pseudodipéptido Boc-GlyΨ[CH(CN)NH]Glu(O^tBu)-OMe (**154**) aplicando las condiciones utilizadas previamente para la síntesis de pseudopéptidos de GPE, que implica la reacción, catalizada por ZnCl₂, de un α-aminoaldehído *N*-protegido con un aminoácido *N*-desprotegido a -20 °C y posterior adición *in situ* de CNTMS sobre la imina intermedia formada. Así, la reacción entre Boc-Gly-H y H-Glu(O^tBu)-OMe·HCl condujo a la obtención de la mezcla de diastereoisómeros (*R,S*)-**154**, cuya separación cromatográfica no fue posible, con un 87% de rendimiento y en una proporción aproximada de 1:1 (Esquema 3.21). La posterior reducción del grupo CN se llevó a cabo mediante hidrogenación catalítica durante 3 horas a t.a. en presencia de un equivalente de ácido acético, obteniéndose la mezcla de epímeros de pseudodipéptidos reducidos Ψ[CH(CH₂NH₂)NH], (*R,S*)-**155** (44%), que tampoco pudieron separarse por cromatografía, junto con pequeñas cantidades de las 2-oxopiperazinas **156** (≈ 18%) resultantes de la lactamización de estos pseudodipéptidos^{**}. Al variar las condiciones de reacción de hidrogenación alargando el tiempo o subiendo la temperatura con el fin de obtener las 2-oxopiperazinas (*R*)- y (*S*)-**156** en un solo paso de reacción, se obtuvieron mezclas complejas difíciles de resolver, por lo que se decidió realizar la lactamización aislando previamente la mezcla diastereomérica (*R,S*)-**155**.

^{**} Hay que señalar que, en los compuestos resultantes de la hidrogenación de pseudopéptidos cianometilnamino, el orden de prelación de los sustituyentes sobre el centro estereogénico del enlace pseudopeptídico cambia, de forma que los epímeros (*R*), tras la reducción del grupo CN, dan lugar a epímeros de configuración (*S*), y viceversa.



a) H-Glu(O^tBu)-OMe·HCl, CNTMS, ZnCl₂, Et₃N, CH₂Cl₂; b) H₂, Pd (C), AcOH.

Esquema 3.21.

De esta manera la lactamización de **(R,S)-155**, se llevó a cabo mediante calefacción a reflujo de tolueno ($\approx 120\text{ }^{\circ}\text{C}$) obteniéndose las 2-oxopiperazinas deseadas **(R)**- y **(S)-156** (43 y 50% respectivamente) las cuales pudieron ser separadas por cromatografía en columna. En ningún caso se observó la lactamización entre la amina secundaria y el éster *terc*-butílico presentes en la molécula.

La asignación de la configuración absoluta de **(R)**- y **(S)-156** se realizó en base a experimentos 1D-NOESY de cada una de las 2-oxopiperazinas. Así, el diastereoisómero que mostró NOE más intenso entre los protones 3-H y 5-H se asignó como el epímero de configuración (*5S*), con una disposición relativa *cis* entre dichos protones, mientras que el epímero (*5R*) mostró un débil efecto NOE característico de una disposición relativa *trans* entre 3-H y 5-H (Figura 3.19).

Las 2-oxopiperazinas **156** se utilizaron como intermedio común para la síntesis de los derivados bicíclicos de 1,6-dioxoperhidropirrol[1,2-*a*]pirazina y 3,7-dioxoperhidropirazino[1,2-*a*]pirazina indicados en el Esquema 3.22. Así, al tratar **(R)**- y **(S)-156** con

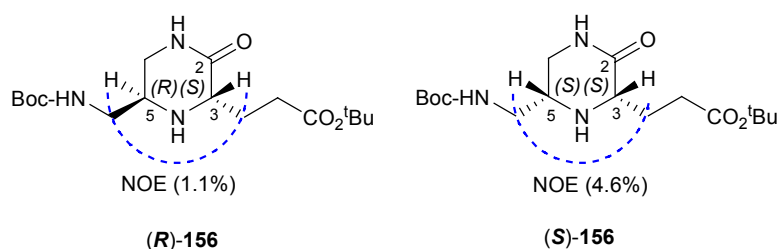
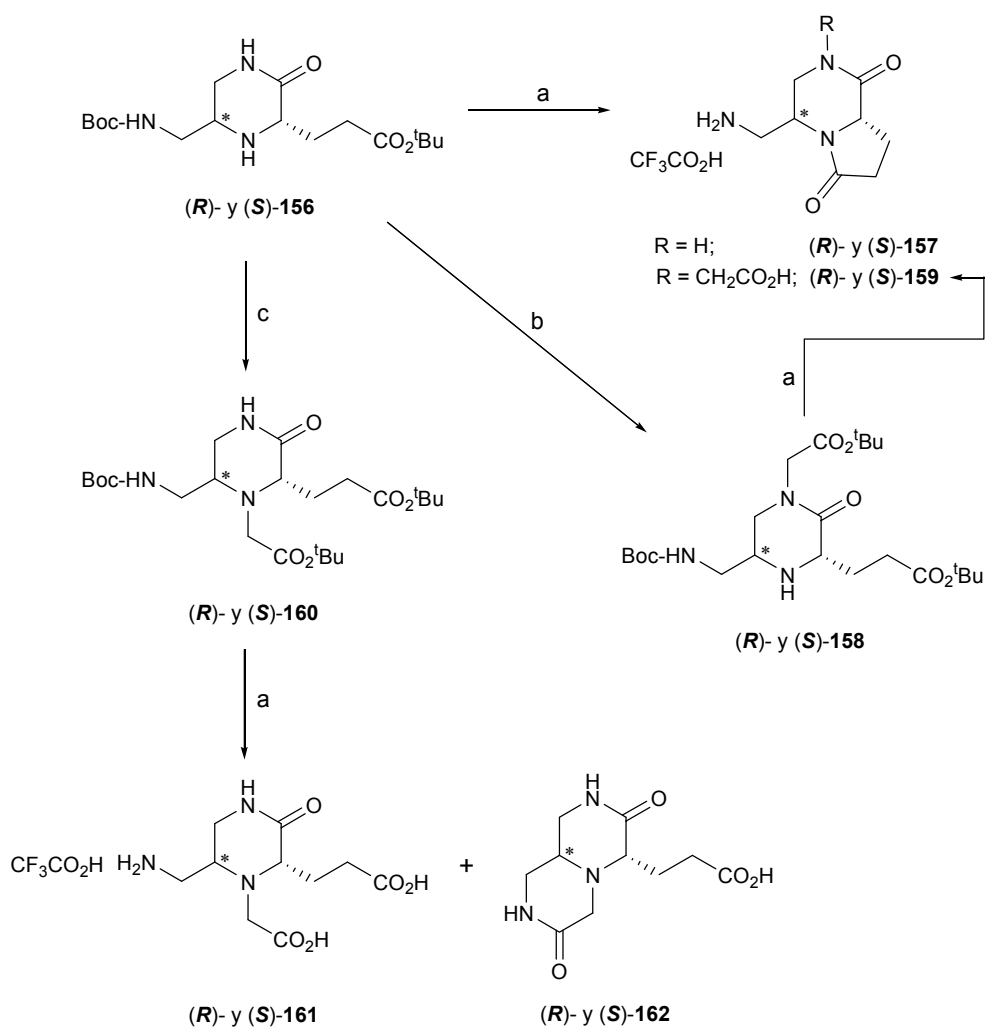


Figura 3.19.

TFA se obtuvieron directamente los bicíclidos derivados de 1,6-dioxoperhidropirrólo[1,2-*a*]pirazina (*R*)- y (*S*)-**157** cuantitativamente^{††}, resultantes de la γ -lactamización, no detectándose la presencia de la 2-oxopiperazina correspondiente desprotegida. Los derivados *N*-2- sustituidos (*R*)- y (*S*)-**159** se obtuvieron mediante una γ -lactamización similar seguida de tratamiento con TFA de las correspondientes oxopiperazinas 1,3,5-trisustituidas (*R*)- y (*S*)-**158**. Estos derivados trisustituidos fueron obtenidos por *N*-carboximetilación del nitrógeno lactámico del anillo de oxopiperazina de (*R*)- y (*S*)-**156** con buenos rendimientos (71 y 96% respectivamente), mediante tratamiento con NaH y posterior adición de bromoacetato de *tert*-butilo en atmósfera inerte¹⁴¹. La carboximetilación de estas oxopiperazinas tuvo lugar en el nitrógeno amínico cuando la reacción se llevó a cabo utilizando este agente alquilante y DIEA en tolueno a reflujo¹⁴², dando así lugar a las oxopiperazinas 3,4,5-trisustituidas (*R*)- y (*S*)-**160** con rendimientos del 64 y 69% respectivamente. A continuación, al tratar cada uno de los diastereoisómeros (*R*)- o (*S*)-**160** con TFA se obtuvo una mezcla de las correspondientes 2-oxopiperazinas desprotegidas (*R*)- y (*S*)-**161**^{††}, y los bicíclidos derivados de 3,7-dioxoperhidropirazino[1,2-*a*]pirazina (*R*)- y (*S*)-**162**^{††} resultantes de la δ -lactamización. La mezcla de derivados mono- y bicíclicos pudo ser separada, tanto en los diastereoisómeros (3*S*,5*R*) como (3*S*,5*S*), por cromatografía en fase reversa, obteniendo una relación de oxopiperazinas (**161**) y las correspondientes pirazinopirazinas (**162**) de

^{††} Cabe destacar que en los compuestos **157**, **161** y **162**, resultantes de la *N*-Boc desprotección de pseudopéptidos cianometilamino y los resultantes de *N*-carboxialquilación en posición 1 (**158**), el orden de prelación de los sustituyentes sobre el centro estereogénico del enlace pseudopeptídico cambia respecto a su correspondiente antecesor, de forma que los epímeros (*R*), dan lugar a epímeros de configuración (*S*), y viceversa.

aproximadamente 3:2. En ambos diastereoisómeros, la lactamización de **161** para conducir al biciclo **162** tuvo lugar en disolución a t.a. con el transcurso del tiempo.



a) TFA, CH_2Cl_2 ; b) NaH, $\text{BrCH}_2\text{CO}_2^t\text{Bu}$, THF, Ar; c) DIEA, $\text{BrCH}_2\text{CO}_2^t\text{Bu}$, tolueno, Δ .

Esquema 3.22.

3.4.2. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

Ninguno de los compuestos ensayados como ligandos de GluRs incluidos en este apartado [(*R*)-, (*S*)-**159**, (*R*)-, (*S*)-**161** y (*R*)-, (*S*)-**162**] mostró afinidad alguna por estos receptores a concentraciones inferiores a 100 μ M (datos no mostrados).

Estos compuestos también fueron evaluados en cultivos neuronales sometidos a condiciones de privación de oxígeno y glucosa, no observándose para ninguno de ellos efecto neuroprotector a 100 μ M (datos no mostrados), excepto el análogo (*S*)-**162**, que mostró un débil a moderado efecto neuroprotector de $11.3 \pm 4.3\%$ y $21.0 \pm 7.7\%$ a 10 y 100 μ M respectivamente, comparable, aunque inferior, al observado por GPE según la Figura 3.18.

3.5. OXOPIPERAZINAS BICÍCLICAS ANÁLOGAS DE cPG

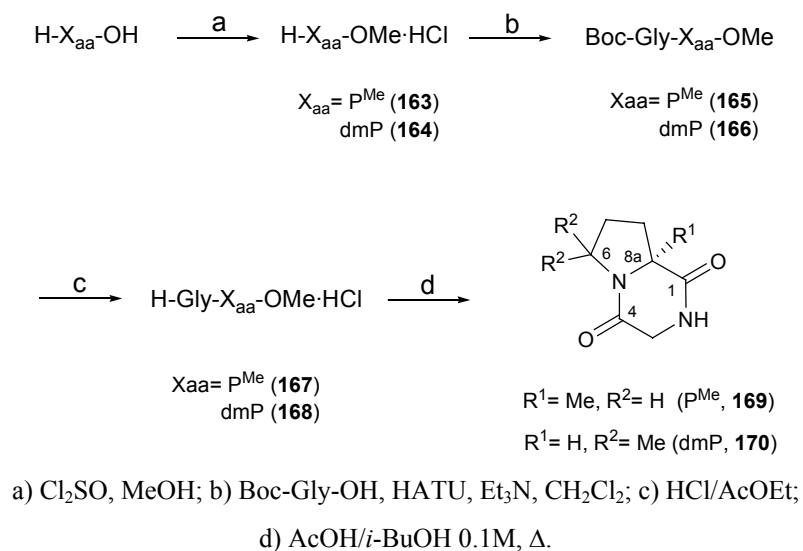
Como se ha comentado en la introducción, la 2,5-dicetopiperazina correspondiente a ciclo(Pro-Gly) (cPG, **2**) es un compuesto endógeno con efecto neuroprotector que ha sido propuesto por algunos autores como metabolito del tripéptido Gly-Pro-Glu (GPE, **1**)¹⁴. El primer apartado de este capítulo recoge la síntesis de una serie de análogos de cPG en los que el residuo de prolina se ha sustituido por el de otros aminoácidos cíclicos. En el segundo, se recoge la preparación de los pseudopéptidos análogos de cPG donde se han sustituido cada uno de los enlaces lactámicos del anillo de 2,5-dicetopiperazina por las agrupaciones [CH₂N-] y [CH(CN)N-]. Este segundo apartado incluye también la obtención de miméticos de GPE mediante manipulación estructural de pseudodipéptidos Ψ [CH(CN)NH] análogos de cPG. Finalmente, en el tercer apartado se da cuenta de los resultados de la evaluación farmacológica de todos los compuestos sintetizados dentro de este capítulo.

3.5.1. SÍNTESIS DE DIPÉPTIDOS CÍCLICOS ANÁLOGOS DE cPG. DERIVADOS DE 2,5-DICETOPIPERAZINAS BICÍCLICAS

El diseño estructural de estos dipéptidos cíclicos se ha basado, esencialmente, en la sustitución del residuo de prolina de cPG por el de aquellos aminoácidos que,

utilizados como sustitutos de este residuo en el tripéptido GPE, condujeron a buenos resultados farmacológicos, bien como ligandos de GluRs o bien como neuroprotectores en los ensayos en cultivos neuronales (Capítulo 3.2.3). Concretamente, se han sintetizado los compuestos ciclo(AA₁-Gly), donde AA₁ = P^{Me}, dmP, Thz y Pip.

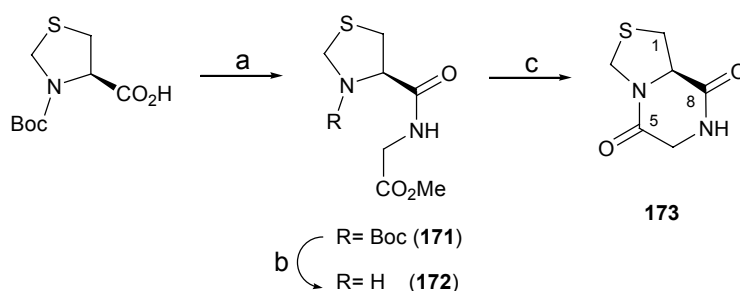
La síntesis de ciclo(AA₁-Gly) [AA₁ = P^{Me} (**169**) y dmP (**170**)] se inició con el acoplamiento, en disolución, del éster metílico del correspondiente derivado de prolina, previamente sintetizado, con Boc-Gly-OH utilizando HATU como reactivo de activación, para dar lugar a los dipéptidos *N* y *C*-protegidos **165** y **166** con buenos rendimientos (Esquema 3.23). Tras eliminación del grupo protector Boc por tratamiento en medio ácido, el tratamiento de los ésteres metílicos **167** y **168** con AcOH/*i*-BuOH 0.1M a reflujo condujo a la formación del anillo de 2,5-dicetopiperazina para dar lugar a las correspondientes 1,4-dioxoperhidropirroló[1,2-*a*]pirazinas **169** y **170**. Es de señalar que ensayos previos de ciclación a reflujo en *i*-BuOH o tolueno, sin presencia de catálisis ácida, condujeron a la recuperación del producto de partida inalterado tras tres días de reacción.



Esquema 3.23.

Por su parte, la síntesis de ciclo(Thz-Gly) (**173**) se llevó a cabo mediante ciclación del éster metílico **172** en el que el residuo de glicina ocupa la posición *C*-

terminal del dipéptido. Así, el acoplamiento entre Boc-Thz-OH y H-Gly-OMe, en presencia de BOP como agente acoplante, condujo al dipéptido *N*- y *C*-protegido **171**¹⁴³ que, tras la eliminación del grupo protector *N*-terminal y posterior lactamización, siguiendo las mismas condiciones que para los análogos derivados de P^{Me} y dmP **169** y **170**, dio lugar a la 5,8-dioxoperhidrotiazolo[3,4-*a*]pirazina **173**⁹⁶ con rendimientos moderados (59%) (Esquema 3.24).

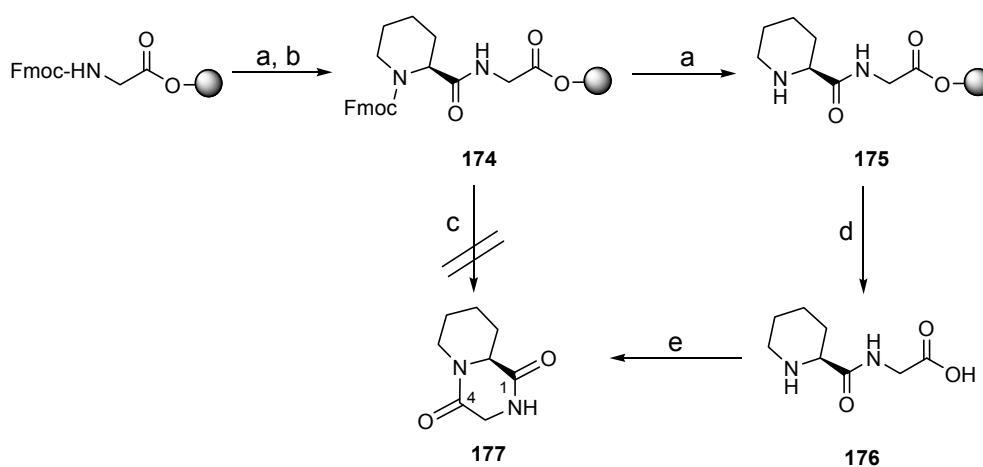


a) H-Gly-OMe·HCl, BOP, DIEA, CH₂Cl₂; b) HCl/AcOEt; c) AcOH/*i*-BuOH 0.1M, Δ.

Esquema 3.24.

Teniendo en cuenta que en síntesis de péptidos en fase sólida, la utilización de resinas *p*-alcoxibencílicas conduce a la formación prácticamente cuantitativa de 2,5-dicetopiperazinas durante la eliminación del grupo protector Fmoc con piperidina/DMF en las condiciones usuales, máxime si el aminoácido *C*-terminal es Pro o Gly^{103, 144}, consideramos de interés explorar este método para la preparación de las 2,5-dicetopiperazinas análogas de cPG propuestas. Para ello, se llevó a cabo el acoplamiento de Fmoc-Pip-OH al residuo de glicina incorporado a una resina tipo Wang *p*-alcoxibencílica de poliestireno, siguiendo la misma metodología de síntesis de péptidos en fase sólida utilizada en el Capítulo 3.2.1, dando así lugar al derivado dipeptídico **174**. Sin embargo, cuando sometimos este compuesto al tratamiento con piperidina/THF o con BEMP/THF no se obtuvo, en ningún caso, la dicetopiperazina deseada **177**. Por tanto, se procedió a eliminar por completo el grupo Fmoc y desanclar de la resina el compuesto resultante utilizando una mezcla de TFA/H₂O (19:1) que condujo a la recuperación del dipéptido lineal *N*- y *C*-desprotegido **176** como único producto de reacción, como se pudo comprobar al analizar los espectros de RMN y masas del residuo obtenido. Este

compuesto se cicló en disolución mediante calefacción en medio ácido para conducir finalmente a la 1,4-dioxoperhidropirido[1,2-*a*]pirazina **177**, correspondiente a ciclo(Pip-Gly), con buenos rendimientos (Esquema 3.25). El derivado **177** ya había sido sintetizado en disolución previamente por De Costa *et al.*¹⁴⁵ mediante ciclación en medio básico partiendo del éster metílico de **176**, con un rendimiento inferior al obtenido en nuestro caso (55% en la reacción de lactamización de H-Pip-Gly-OMe, frente a un rendimiento global del 87% con nuestro método).



a) piperidina/DMF 20%; b) Fmoc-Pip-OH, HOBt, DIC, DMF; c) piperidina/THF (20%)
o BEMP (5 eq.)/THF; d) TFA/H₂O (19:1); e) AcOH/*i*-BuOH 0.1M, Δ.

Esquema 3.25.

3.5.2. SÍNTESIS DE PSEUDODIPÉPTIDOS CÍCLICOS $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ Y $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ ANÁLOGOS DE cPG. DERIVADOS DE 2-OXOPIPERAZINAS BICÍCLICAS

Como se ha indicado en la introducción a este Apartado 3.5, se ha sustituido cada uno de los carbonilos lactámicos del anillo de 2,5-dicetopiperazina de cPG por los grupos

CH₂ y CH(CN) para dar lugar a los pseudodipéptidos cíclicos análogos de cPG en cuya estructura bicíclica incorporan el anillo de 2-oxopiperazina. Es de señalar que si bien la 1,4-dioxoperhidropirrol[1,2-*a*]pirazina correspondiente a la estructura de ciclo(Pro-Gly) es idéntica a la de ciclo(Gly-Pro), no ocurre lo mismo con los pseudodipéptidos resultantes de la sustitución de uno u otro de los grupos carbonilo presentes en dicha estructura. Así, las citadas sustituciones conducen a pseudodipéptidos ciclo(GlyΨ[]Pro) cuando éstas tienen lugar en el carbonilo en posición 4 del biciclo, mientras que cuando tienen lugar en la posición 1 conducen a pseudodipéptidos ciclo(ProΨ[]Gly) (Figura 3.20).

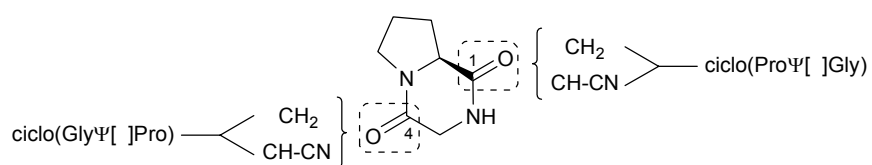
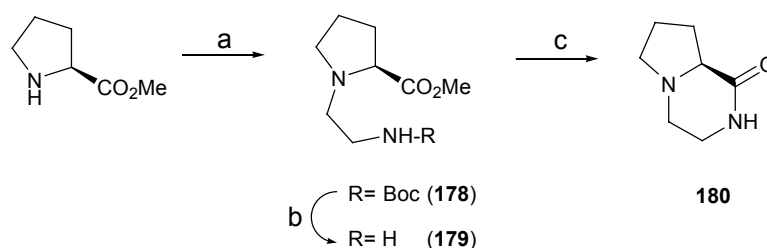


Figura 3.20. Sustituciones en cPG conducentes a análogos pseudodipeptídicos Ψ[CH₂N] y Ψ[CH(CN)N].

1-Oxoperhidropirrol[1,2-*a*]pirazinas: Pseudodipéptidos cíclicos derivados de ciclo(GlyΨ[]Pro)

Para la formación de ciclo(GlyΨ[CH₂N]Pro) (**180**)¹⁴⁶ inicialmente se siguió el procedimiento utilizado con anterioridad para la incorporación del enlace Ψ[CH₂N], consistente en una reacción de aminación reductiva entre Boc-Gly-H y H-Pro-OMe·HCl, pero la reacción fue infructuosa obteniéndose mezclas complejas de reacción. La síntesis de éste pseudodipéptido cíclico se realizó con buenos rendimientos mediante *N*-alquilación de H-Pro-OMe con *N*-(2-bromoetil)carbamato de *tert*-butilo, obteniéndose el pseudodipéptido lineal **178**¹⁴⁷, seguido de eliminación del grupo protector Boc y posterior lactamización (Esquema 3.26).



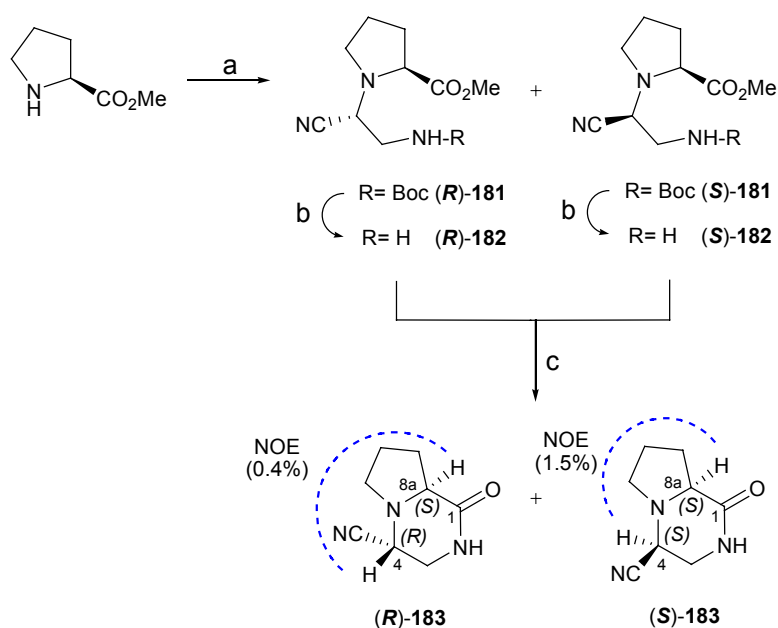
a) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$, Et_3N , CH_3CN ; b) HCl/AcOEt ; c) $\text{AcOH}/i\text{-BuOH}$ 0.1M, Δ .

Esquema 3.26.

La formación del enlace $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{N}]$ para la síntesis de ciclo(Gly $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{N}]\text{Pro}$) (**183**) se llevó a cabo mediante reacción modificada de Strecker haciendo reaccionar Boc-Gly-H con H-Pro-OMe·HCl y posterior adición de CNTMS, obteniéndose, con un rendimiento total del 53%, una mezcla de epímeros en el nuevo centro quiral en proporción 65:35 (Esquema 3.27). Si bien esta mezcla pudo ser separada por cromatografía en los correspondientes diastereoisómeros (*R*) y (*S*)-**181**, no fue posible, en principio, la asignación configuracional de cada uno de ellos. Estos diastereoisómeros fueron tratados por separado en medio ácido para obtener los correspondientes pseudodipéptidos *N*-desprotegidos (*R*) y (*S*)-**182** de manera cuantitativa en ambos casos. En un primer intento, la reacción de ciclación de los pseudodipéptidos se abordó por tratamiento a reflujo en $\text{AcOH}/i\text{-BuOH}$ 0.1M, dando como resultado la ruptura del enlace cianometilnamino y recuperándose el éster de prolina de partida. Al utilizar condiciones de catálisis básica (Et_3N , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 40 °C), los pseudodipéptidos (*R*)- y (*S*)-**182** ciclaron lentamente (5 días) dando lugar, en ambos casos, además de a un 15-25% de H-Pro-OMe, a una pareja de diastereoisómeros bicíclicos **183** con configuración (4*R*,8*aS*) [(*R*)-**183**] y (4*S*,8*aS*) [(*S*)-**183**], que fueron separados cromatográficamente. El hecho de que la epimerización durante el transcurso de la ciclación tuviera lugar en el carbono que soporta el grupo CN, se dedujo a partir de resultar prácticamente idénticos los valores de poder rotatorio para cada uno de los diastereoisómeros *cis* y *trans* obtenidos en la lactamización, tanto del pseudodipéptido mayoritario (*R*)-**182** como del (*S*)-**182** minoritario y, por tanto, obtenerse los dos mismos biciclos a partir de cualquiera de cada uno de ellos. En el caso de que la epimerización hubiese tenido lugar en el residuo de prolina, (*R*)-**182** hubiera conducido a dos biciclos

con configuraciones (4*R*,8*aS*) y (4*R*,8*aR*), respectivamente, mientras que los biciclos obtenidos a partir de (*S*)-**182** tendrían las configuraciones (4*S*,8*aS*) y (4*S*,8*aR*) y, de ahí, que los diastereoisómeros *cis*, de la misma manera que los *trans*, serían entre ellos enantiómeros.

Es de señalar que el pseudodipéptido cíclico (*R*)-**183** se obtuvo en mayor proporción tanto partiendo de (*R*)- como de (*S*)-**182**. Así el pseudodipéptido (*R*)-**182** condujo a una mezcla de (*R*)-**183**:(*S*)-**183** en proporción 71:29 (rendimiento total 28%) mientras que el pseudodipéptido minoritario, (*S*)-**182**, dio lugar a una mezcla (*R*)-**183**:(*S*)-**183** de 85:15 (rendimiento total 47%). Estas proporciones fueron medidas en el espectro de ¹H-RMN de cada una de las mezclas epiméricas.



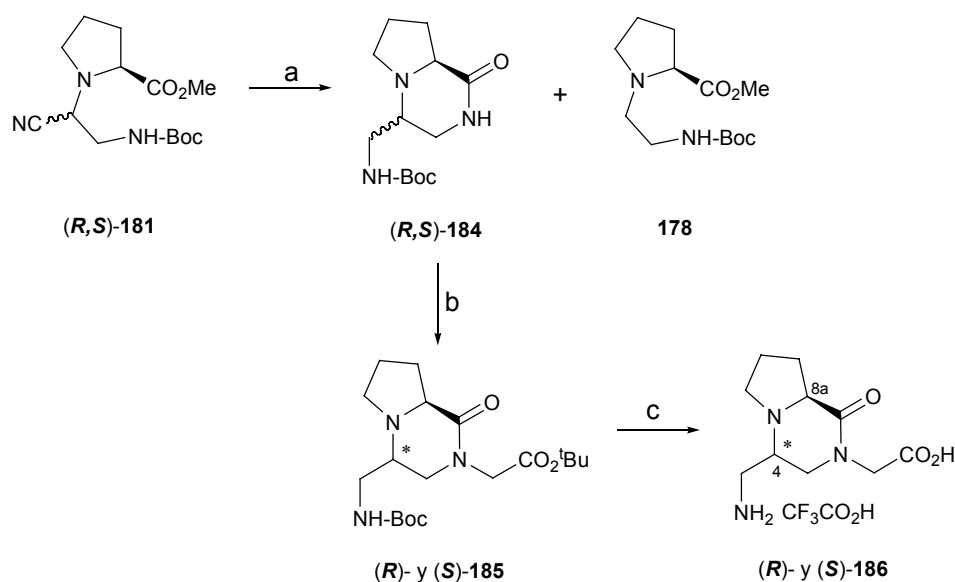
a) Boc-Gly-H (**144**), CNTMS, ZnCl₂, Et₃N, CH₂Cl₂; b) HCl/AcOEt;
 c) Et₃N, CH₂Cl₂/MeOH, 40 °C.

Esquema 3.27.

La configuración absoluta de (*R*)- y (*S*)-**183** se determinó en base a experimentos 1D-NOESY de cada uno de ellos. Así, el epímero minoritario mostró NOE más intenso (1.5%) entre los protones 4-H y 8a-H asignándose como el epímero de configuración

(4*S*), con una disposición relativa *cis* entre dichos protones, mientras que el epímero mayoritario (4*R*) mostró un débil efecto NOE (0.4%) característico de una disposición relativa *trans* entre 4-H y 8a-H (Esquema 3.27).

La posibilidad de reducir el grupo ciano y de alquilar el nitrógeno lactámico de estas 1-oxoperhidropirrollo[1,2-*a*]pirazinas, nos llevó a plantearnos la obtención de 4-aminometil-2-carboxialquil derivados que podrían considerarse miméticos del tripéptido GPE, estructuralmente relacionados con las oxopiperazinas mono- y bicíclicas incluidas en el Esquema 3.22 del Apartado 3.4.1. Para ello, llevamos a cabo el tratamiento de la mezcla diastereomérica de pseudodipéptidos protegidos (**(*R,S*)-181** (*R:S*, 65:35) con Ni Raney en atmósfera de hidrógeno, lo que condujo a la reducción y consiguiente lactamización para dar lugar directamente a la correspondiente mezcla de derivados bicíclicos (**(*R,S*)-184**, en un 36% (Esquema 3.28). El espectro de ¹H-RMN de este biciclo determinó una relación 4*R*:4*S* sensiblemente igual a la del centro quiral del enlace Ψ[CH(CN)N] del producto de partida, lo que parece indicar que no ha tenido lugar epimerización en dicho centro. Esta hidrogenación condujo también a la pérdida del



a) H₂, Ni Raney, MeOH; b) NaH, BrCH₂CO₂^tBu, THF, Ar; c) TFA, CH₂Cl₂.

Esquema 3.28.

grupo CN para dar lugar al derivado pseudodipeptídico lineal $\Psi[\text{CH}_2\text{N}]$ **178**, en un 33%. Cuando la hidrogenación se realizó utilizando Pd(C) al 10%, como catalizador, el porcentaje del compuesto **178** aumentó hasta un 45%, no detectándose en este caso, el biciclo aminometil sustituido **184**.

La reacción de (*R,S*)-**184** con bromoacetato de *tert*-butilo condujo, con un 75% de rendimiento, a la mezcla de diastereoisómeros *N*-2-carboxialquilados [(*R*)- o (*S*)-**185**]^{††} que, aunque se separaron por cromatografía en columna, no se pudo asignar su correspondiente configuración, (4*R*,8a*S*) o (4*S*,8a*S*), debido al solapamiento de señales que mostraron sus espectros de ¹H-RMN. Esta asignación se pudo realizar en base a experimentos NOESY de cada uno de los análogos desprotegidos (*R*) y (*S*)-**186**, obtenidos cuantitativamente por tratamiento con TFA/CH₂Cl₂ de (*R*)- y (*S*)-**185**. Así, en el espectro NOESY del producto mayoritario no se observó pico de correlación entre los protones 4-H y 8a-H, indicando una disposición relativa *trans* entre ellos y asignándose, por tanto la configuración (4*S*). Sin embargo, el espectro del producto minoritario mostró un pico de correlación entre los protones 4-H y 8a-H, indicativo de una disposición relativa *cis* entre dichos protones, por lo que se asignó como el epímero de configuración (4*R*). Esta asignación permitió establecer como *R* la configuración absoluta del carbono quiral del enlace $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{N}]$ del diastereoisómero mayoritario de la mezcla de pseudodipeptidos de partida **181**. (Figura 3.21).

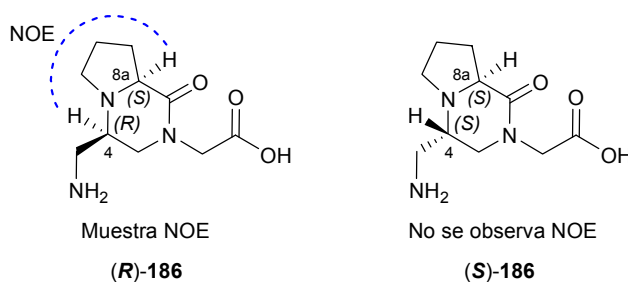
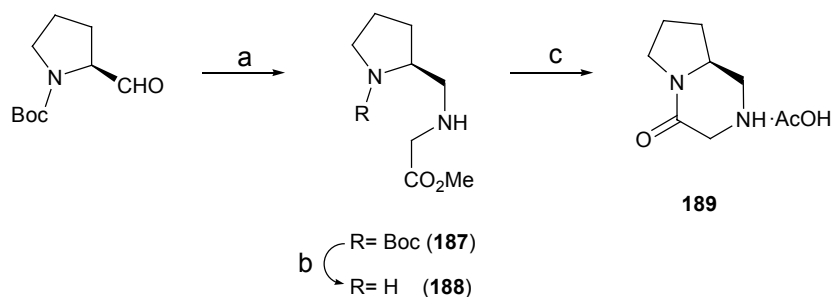


Figura 3.21.

^{††} Cabe destacar que en los compuestos (*R*)- y (*S*)-**185** resultantes de la *N*-alquilación en posición 2 de (*S*)- y (*R*)-**184**, el orden de prelación de los sustituyentes sobre el centro estereogénico del enlace pseudopeptídico cambia respecto a su correspondiente antecesor, de forma que los epímeros (*R*), dan lugar a epímeros de configuración (*S*), y viceversa.

4-Oxoperhidropirrolo[1,2-*a*]pirazinas: Pseudodipéptidos cíclicos derivados de ciclo(ProΨ[]Gly)

La síntesis de ciclo(ProΨ[CH₂NH]Gly) (**189**)¹⁴⁸ se llevó a cabo, en primer lugar, mediante reacción de aminación reductiva entre Boc-Pro-H (**138**) y H-Gly-OMe, obteniendo el pseudodipéptido lineal *N*-y *C*-protegido **187**¹⁴⁸ el cual fue tratado en medio ácido para eliminar el grupo protector Boc, y, finalmente, ciclado en AcOH/*i*-BuOH 0.1M, para formar el anillo de piperazinona (Esquema 3.29). Con el fin de descartar la posible racemización del centro quiral presente en la molécula durante el proceso de síntesis, la pirrolopirazina **189** se transformó en el correspondiente derivado del ácido de Mosher mediante acilación con el cloruro de (*R*)-MTPA, obteniendo un único diastereoisómero como se pudo comprobar al observarse un único pico por HPLC-MS y no observar duplicidad de señales en los espectros de ¹H y ¹³C-RMN.



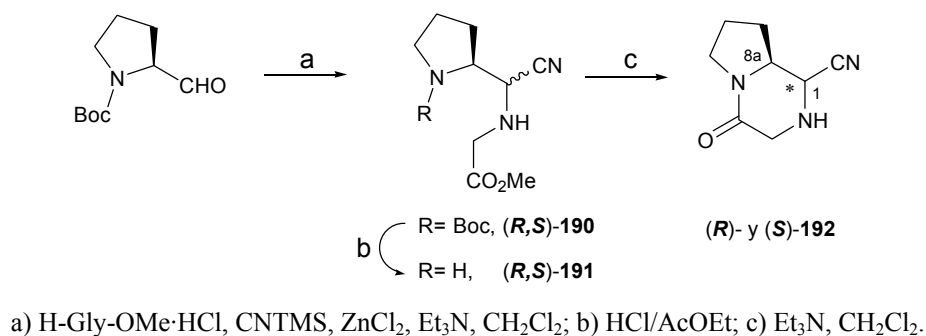
a) H-Gly-OMe·HCl, NaBH₃CN, ZnCl₂, Et₃N, tamiz 4Å, CH₂Cl₂; b) HCl/AcOEt;

c) AcOH/*i*-BuOH 0.1M, Δ.

Esquema 3.29.

Como se observa en el Esquema 3.30, la síntesis de ciclo(ProΨ[CH(CN)NH]Gly) (**192**) se abordó mediante la reacción tipo Strecker usual partiendo de Boc-Pro-H y H-Gly-OMe, obteniendo los pseudodipéptidos protegidos **190** como una pareja de epímeros en el nuevo centro quiral, en una relación 70:30, que no pudieron separarse por cromatografía. Tras eliminación del grupo protector Boc, la correspondiente mezcla de diastereoisómeros (*R,S*)-**191** se cicló a t.a. durante 48 horas, para obtener, en la citada proporción, la mezcla de 1-ciano-4-oxoperhidropirrolo[1,2-*a*]pirazinas (*R*)- y (*S*)-**192** en

un rendimiento del 83%, que se separaron por cromatografía y, a continuación, se asignó su respectiva configuración. La configuración absoluta de (*R*)- y (*S*)-**192** se determinó en base a los valores de la constante de acoplamiento entre los protones 1-H y 8a-H del anillo de perhidropirrolpirazina ($^3J_{1,8a}$) en el espectro de ^1H -RMN. Así, la 4-oxopirrolpirazina minoritaria (*S*)-**192** mostró una $^3J_{1,8a}$ de 3.8 Hz, característica de una disposición *cis* para los protones 1-H y 8a-H, mientras que para (*R*)-**192** el valor de esta constante fue de 9.0 Hz, característica de una disposición *trans* para dichos protones. Con el objeto de descartar la epimerización de C_{8a} durante la síntesis y, así, la obtención de mezclas de dos parejas enantioméricas, se transformaron, nuevamente, las pirrolpirazinas (*R*)- y (*S*)-**192** en los correspondientes derivados del ácido de Mosher por tratamiento con el cloruro de (*R*)-MTPA, observando la presencia de un único diastereoisómeros en ambos casos, tanto en los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN como en HPLC-MS.



Esquema 3.30.

3.5.3. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

Las oxopiperazinas bicíclicas, incluidas en este apartado, se han evaluado farmacológicamente “in vitro” realizando los ensayos indicados anteriormente a lo largo de este Capítulo 3, excepto los compuestos (*R*)- y (*S*)-**183** y (*R*)- y (*S*)-**186** cuyo efecto

neuroprotector en cultivos neuronales expuestos a NMDA no ha sido determinado. En todas las evaluaciones los productos modelo, GPE y cPG, se han incluido a efectos comparativos.

A diferencia de GPE, ni cPG ni ninguno de los dipéptidos- o pseudodipéptidos cíclicos análogos aquí sintetizados mostraron afinidad por GluRs a concentraciones inferiores a 100 μ M (datos no mostrados). Tampoco mostraron afinidad a esa concentración los derivados de 1-oxoperhidropirrol[1,2-*a*]pirazinas (*R*)- y (*S*)-**186**, diseñados como miméticos de GPE. La falta de afinidad de cPG por estos receptores parece contradecir la patente de Tran¹⁴, en la que se refiere a este dipéptido cíclico como un nuevo antagonista de receptores NMDA/AMPA. Esa misma patente, en la que dicen haber descubierto que cPG es el metabolito final de GPE, se predice que este metabolito debe poseer un efecto neuroprotector muy potente para superar el efecto neurotóxico intrínseco del ácido glutámico, el otro metabolito. Sin embargo, en nuestro ensayo, el porcentaje de protección del daño neuronal ocasionado por NMDA es menor tras la administración de cPG que del tripéptido GPE, tanto a dosis de 100 μ M como de 10 μ M, siendo virtualmente inexistente la neuroprotección mostrada por el dipéptido cíclico a esta última concentración (Figura 3.22). Por tanto, este resultado no apoya que GPE sea un profármaco de cPG como se postula en la citada patente.

Como se indica en dicha figura, los análogos de cPG derivados de 2,5-dicetopiperazina, **169**, **170** y **173** mostraron un efecto neuroprotector similar o inferior al del dipéptido modelo a las citadas concentraciones, efecto que resultó muy inferior o inexistente en la derivada de Pip **177**. Es de señalar que, de la misma manera que ocurre con cPG en relación con GPE, estos cuatro dipéptidos cíclicos portadores de P^{Me}, dmP, Thz y Pip (**169**, **170**, **173** y **177**, respectivamente) previnieron la muerte neuronal provocada por NMDA en una proporción de 1.5 a 2.5 veces inferior a la que lo hicieron los correspondientes análogos tripeptídicos GAA₂E [AA₂ = P^{Me} (**39**), dmP (**41**), Thz (**40**) y Pip (**32**)] (Comparar Figuras 3.14 y 3.22). Respecto a los pseudodipéptidos cíclicos Ψ [CH₂NH] (**180** y **189**) y Ψ [CH(CN)NH] (**192**), destaca ciclo(Pro Ψ [CH₂NH]Gly) (**189**) por provocar un efecto neuroprotector frente a NMDA prácticamente idéntico al del modelo cPG, mientras que el efecto de su regioisómero ciclo(Gly Ψ [CH₂N]Pro) (**180**) es

muy débil, incluso a 100 μ M. Este resultado parece indicar la necesidad del grupo carbonilo en posición 4 de la estructura de 1,4-dioxoperhidropirrol[1,2-*a*]pirazina de cPG frente a la irrelevancia del de la posición 1. El alto porcentaje de protección de **189** a 100 μ M decae drásticamente al incorporar, en cualquier disposición, un grupo CN en posición 1 de la 4-oxoperhidropirrol[1,2-*a*]pirazina para conducir a los correspondientes Ψ [CH(CN)NH] [(*R*)- y (*S*)-**192**].

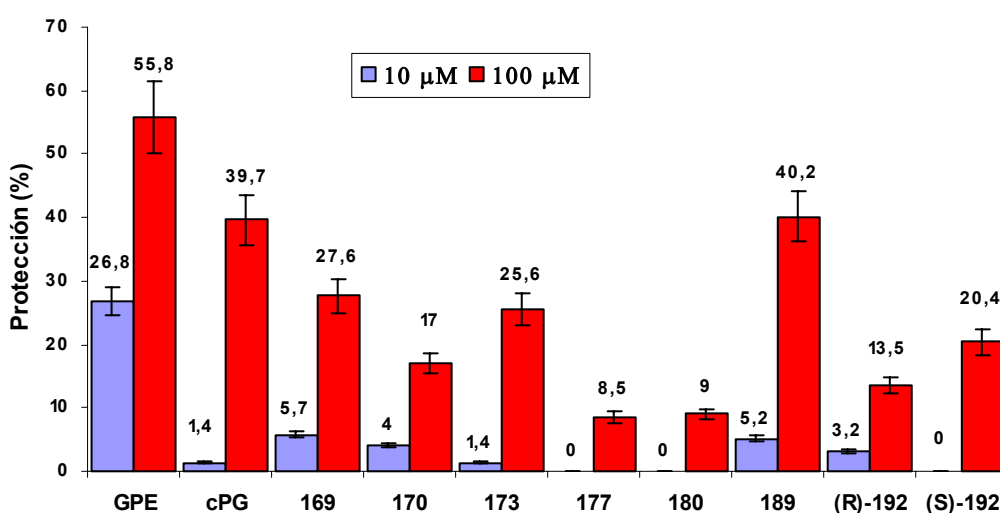


Figura 3.22. Porcentaje de protección de cultivos neuronales de hipocampo de rata a excitotoxicidad inducida por NMDA (100 μ M). La supervivencia celular se determinó por medida de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre el derivado de tetrazolio MTT. Los valores indicados representan el valor medio \pm la desviación estándar de 6-9 experimentos.

Ciclo(Pro Ψ [CH₂NH]Gly) fue, asimismo, el único pseudodipéptido cíclico capaz de incrementar considerablemente la supervivencia neuronal tras el daño originado por OGD con un valor de protección a 10 μ M de 32.5%, sensiblemente idéntico al mostrado por cPG y los dipéptidos cíclicos análogos **169**, **170**, **173** y **177** a esa concentración (Figura 3.23). Aunque con efecto neuroprotector aún significativo, particularmente a 100 μ M (13-20%), tanto los pseudodipéptidos Ψ [CH(CN)NH] (*R*)- y (*S*)-**192** como el Ψ [CH₂N] **180**, mostraron, como en el ensayo anterior, un fuerte descenso en los porcentajes de protección respecto a **189**. Sin embargo, a diferencia del ensayo de

protección frente a neurotoxicidad ocasionada por NMDA, en este segundo ensayo los porcentajes de neuroprotección de los dipéptidos cíclicos **169**, **170**, **173** y **177** en los que se ha sustituido el residuo de Pro de cPG por P^{Me}, dmP, Thz y Pip, respectivamente, son, en términos generales, ligeramente inferiores (100 μ M) o ligeramente superiores (10 μ M) a los de este modelo. Otra diferencia, y muy importante, entre ambos ensayos en cultivos neuronales, es la resultante de comparar los datos de GPE con los de cPG. Así, como se acaba de indicar, la actividad neuroprotectora de GPE es claramente superior a la de cPG frente a la muerte neuronal inducida por NMDA, particularmente a la concentración de 10 μ M en que no existe efecto protector por parte del dipéptido cíclico. Por el contrario, en condiciones de privación de oxígeno y glucosa, cPG, a 10 μ M, muestra un efecto neuroprotector similar o muy ligeramente superior a GPE, superioridad que aumenta significativamente a 100 μ M. La similitud en los porcentajes de neuroprotección del daño producido por OGD a 10 μ M (GPE, 33.5 \pm 3.4 y cPG, 32.8 \pm 9.2) tampoco parece apoyar a GPE como profármaco de cPG.

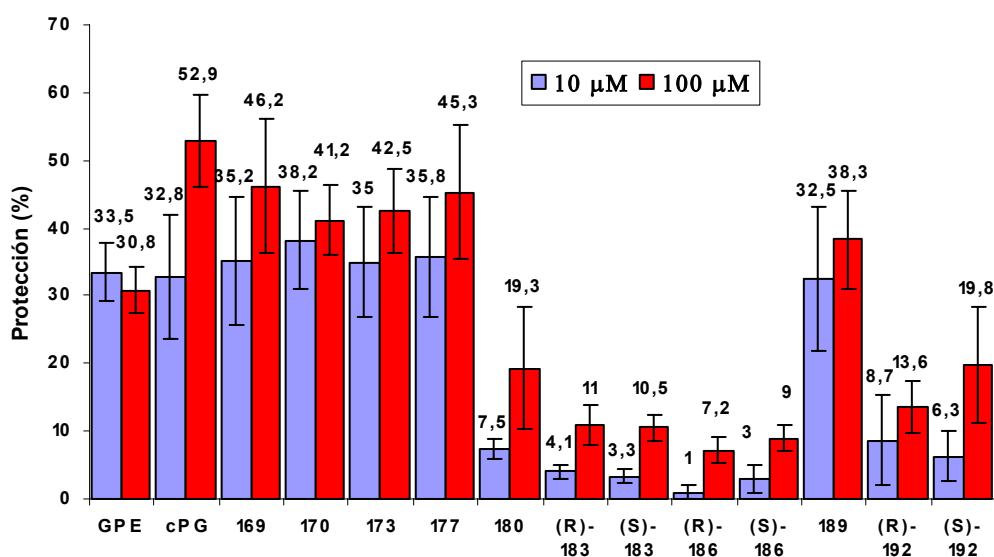


Figura 3.23. Porcentaje de protección de cultivos neuronales de hipocampo de rata a daño inducido por privación de oxígeno y glucosa. La supervivencia celular se determinó por medida de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre el derivado de tetrazolio MTT. Los valores indicados representan el valor medio \pm la desviación estándar de 6-9 experimentos.

4. CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

En respuesta a los objetivos planteados en el Capítulo 2 “....el objetivo de este trabajo es la obtención de miméticos de GPE metabólicamente estables así como de análogos de cPG que pudieran servir para explorar una nueva estrategia en la búsqueda de nuevos agentes neuroprotectores y, a su vez, para ser utilizados como herramientas farmacológicas para esclarecer el mecanismo de acción de GPE”, los resultados obtenidos en cada uno de los Apartados del Capítulo 3, conducen a las conclusiones finales siguientes, como más significativas:

1. Se han obtenido análogos peptídicos y pseudopeptídicos ($\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ y $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$) de GPE con efecto neuroprotector en cultivos neuronales similar, o superior, a los de este tripéptido. Así, la muerte neuronal ocasionada por administración de NMDA (100 μM) se previno por pretratamiento con Gly-Pro-D-Glu o con Gly-D-Pro-Glu en medida ligeramente mayor que por pretratamiento con GPE, tanto a concentraciones de 10 como de 100 μM . Respecto al daño provocado por privación de oxígeno y glucosa (OGD), el porcentaje de supervivencia neuronal producido por Gly-D-Pro-Glu, Gly-D-Pro-D-Glu y Gly-Pro $\Psi[(R)\text{CH}(\text{CN})\text{N}]\text{Glp}$ fue claramente superior al producido por GPE a las citadas concentraciones. No obstante, la mayor potencia neuroprotectora fue la proporcionada por Gly $\Psi[\text{CH}_2\text{N}]\text{Pro-Glu}$, tras el daño producido por OGD. Este pseudopéptido mostró valores de protección a 1, 10 y 100 μM de 52, 51 y 83%, respectivamente, valores muy superiores a los de GPE a estas concentraciones (4, 33 y 31%), e incluso mostró un efecto neuroprotector

significativo (22%) a 0.1 μ M, concentración a la que en este ensayo no se detectó neuroprotección alguna por parte de este tripéptido endógeno. Todos los análogos peptídicos y pseudopeptídicos indicados, con efectos neuroprotectores similares o superiores a los de GPE, deben poseer una mayor estabilidad metabólica frente a peptidasas, bien por incorporar aminoácidos D o sustitutos Ψ del enlace peptídico.

2. El análisis conformacional de GPE en agua ha demostrado la preferencia por los conformeros *trans*, frente a los *cis*, alrededor del enlace Gly-Pro, así como que existe un amplio número de conformaciones estabilizadas por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el NH-Glu y el carboxilo de la cadena lateral de Glu. Asimismo, se ha observado un número, aunque menor, de conformaciones estabilizadas por una interacción electrostática entre este carboxilo y el extremo *N*-terminal. No obstante, como en principio cabía esperar, GPE es un tripéptido flexible que no adopta una conformación definida preferente. Por ello, con el fin de abarcar el mayor espacio conformacional posible en el que ir delimitando la(s) posible(s) conformación(es) bioactiva(s), el diseño de miméticos totalmente no peptídicos se ha enfocado hacia la generación de diversos análogos con diferentes tipos y grados de restricción conformacional.
3. En relación con el último párrafo de la conclusión anterior, se han sintetizado una serie de 2-oxopiperazinas y de derivados bicíclicos de éstas con distinta quiralidad, portadores de residuos de Gly y Glu. Ninguno de ellos mostró acción farmacológica en los ensayos realizados, salvo el derivado de 3,7-dioxoperhidropirazino[1,2-*a*] (**S**)-**162** que previno la muerte neuronal causada por OGD de manera débil a moderada (11 y 21%) a concentraciones de 10 y 100 μ M, respectivamente. Desde el punto de vista químico, el citado trabajo sintético ha supuesto la puesta a punto de un procedimiento, que podría ser de aplicación general, para la síntesis de 1,6-dioxoperhidropirrol[1,2-*a*]pirazinas-4-sustituidas y 3,7-dioxoperhidropirazino[1,2-*a*]pirazinas-4-sustituidas, estructuras no descritas en la bibliografía, en nuestro conocimiento.

4. Se han sintetizado una serie de dipéptidos cíclicos y pseudodipéptidos $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ y $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ cíclicos análogos de cPG, que de la misma manera que este modelo, ninguno de ellos fue capaz de fijarse a receptores de glutamato (GluRs) a concentraciones inferiores a 100 μM . A esta concentración, los porcentajes de protección de la excitotoxicidad inducida por NMDA (100 μM), mostrada por los análogos dipeptídicos portadores de residuos de prolina modificadas (8.5-27.5%), fueron menores que el mostrado por cPG (39.5%), mientras que el del pseudodipéptido ciclo(Pro $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]\text{Gly}$) fue totalmente similar (40%). En todos los casos, incluido el del dipéptido cíclico endógeno, el efecto neuroprotector frente a este daño desapareció prácticamente a 10 μM . Por el contrario, a esta concentración, tanto las dioxopiperazinas sintetizadas como la endógena, cPG, previnieron la muerte neuronal causada por OGD de forma considerable y similar entre sí, con valores a su vez similares al de la citada oxopiperazina ciclo(Pro $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]\text{Gly}$) (32.5-38%). Un aumento a 100 μM condujo, en general, a un incremento ligero o moderado en la potencia neuroprotectora del daño originado por OGD, siendo el propio modelo, cPG, el que alcanzó un porcentaje de neuroprotección ligeramente superior (53%).
5. Respecto al mecanismo de acción de GPE, este trabajo ha conducido a las aportaciones siguientes:
 - a) Los datos obtenidos con GPE y todos los análogos incluidos en este trabajo indican claramente que no existe correlación alguna entre su afinidad por GluRs y la correspondiente prevención de muerte neuronal inducida por NMDA en cultivos. Esta falta de correlación parece indicar que, al margen de la afinidad por estos receptores, existen otros mecanismos adicionales responsables, en mayor o menor medida, del efecto neuroprotector de GPE y análogos en este ensayo.
 - b) Ninguno de los resultados obtenidos apoyan la hipótesis por la cual el tripéptido GPE sea un profármaco del dipéptido cíclico cPG. Tampoco se sustenta que cPG sea un antagonista de receptores NMDA.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE GPE

5.1.1. ESPECTROSCOPIA DE RMN

Los experimentos de RMN de GPE se registraron en un espectrómetro Varian SYSTEM 500 equipado con una sonda fría, con una frecuencia de trabajo de 500 MHz para protón o 125 MHz para carbono, y en un espectrómetro INOVA 400 (400 MHz) equipado con una sonda de detección inversa con gradientes, que opera a una frecuencia de 400 MHz para protón o 100 MHz para carbono. Los espectros se obtuvieron utilizando muestras de concentración 165, 55 y 10 mM en H₂O/D₂O (90:10, v/v), a una temperatura de 25 °C. Los espectros de ¹H-RMN se referenciaron a la señal de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato sódico (DSS). Para ¹³C-RMN se utilizó como referencia interna dioxano, asignando su señal a 66.66 ppm. El pH medido de una muestra 10 mM de GPE fue de 4.2. Con el fin de obtener espectros de protón de GPE en sus formas protonada y desprotonada, se prepararon muestras a diferentes pH (2.0, 7.6 y 12.3 respectivamente) mediante adición de HCl o NaOH a partir de una muestra 10 mM de GPE.

Los espectros monodimensionales de ¹H y ¹³C se obtuvieron utilizando condiciones estándar. Los espectros bidimensionales homonucleares gCOSY, NOESY y ROESY fueron adquiridos sobre muestras 55 y 165 mM en modo sensible a la fase. Para el espectro gCOSY se emplearon 4 acumulaciones y se adquirieron los datos en una matriz 1024 x 128 con una anchura espectral de 1600 Hz, un tiempo de espera de 1 s y los

datos se procesaron en una matriz de 1024 x 1024 puntos. En los experimentos NOESY y ROESY se emplearon 8 acumulaciones, se adquirieron los datos en una matriz 2048 x 128 con una anchura espectral de 8012 Hz, se utilizó como tiempo de espera 1.5 s y se procesaron los datos en una matriz de 2048 x 2048 puntos. El tiempo de mezcla fue de 500 ms para el experimento NOESY y 200 ms para el ROESY.

Los espectros 2D heteronucleares gHSQC y gHMBC se registraron sobre una muestra 55 mM empleando 4 y 16 acumulaciones respectivamente. Para el experimento gHSQC los datos se recogieron en una matriz 1024 x 128 con una anchura espectral de 1530 Hz en el dominio de protón y de 12500 Hz en el dominio de carbono, empleando un tiempo de espera de 1 s y procesando los datos en una matriz de 1024 x 2048 puntos. Las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento heteronuclear a un enlace de 130 Hz. En el caso del experimento gHMBC, los datos se recogieron en una matriz 1024 x 400 con una anchura espectral de 1530 Hz en el dominio de protón y de 24100 Hz en el dominio de carbono, empleando un tiempo de espera de 1 s y procesando los datos en una matriz de 1024 x 1024 puntos. Las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento a larga distancia de 8 Hz.

Los espectros fueron procesados en un ordenador PC con Linux empleando el software VNMRj V.2.1 (Varian SYSTEM-500) o una estación de trabajo Sun microsystems Ultra5 (Varian-INOVA 400), utilizando el software Vnmr 6.1C.

La simulación de los espectros teóricos de protón de GPE se llevó a cabo a partir del espectro de protón experimental empleando el programa gNMR V4.0¹⁴⁹.

5.1.2. ESTUDIOS DE MECÁNICA Y DINÁMICA MOLECULAR

Todos los cálculos se llevaron a cabo con el programa HYPERCHEM 7.52^{78, 150} partiendo de cada uno de los rotámeros *cis* y *trans* de GPE. En primer lugar se generaron cada una de las geometrías deseadas, se dispuso el tripéptido con los grupos polares cargados adecuadamente, la estructura se colocó en el centro de una caja de disolvente

acuoso, con unas dimensiones iguales al triple de la distancia entre los extremos del péptido (19x19x19 Å, 216 moléculas de agua) y se optimizó por cálculos de mecánica molecular utilizando el campo de fuerzas AMBER3 aplicando los parámetros intrínsecos del propio programa de cálculo. En el siguiente paso se eliminaron las restricciones impuestas y llevó a cabo el proceso de dinámica molecular utilizando el campo de fuerzas AMBER3. Las estructuras se calentaron a 1000 K en 0.3 ps, se estabilizaron durante 10 ps y se enfriaron lentamente a 300 K. En cada paso la temperatura se disminuyó de 100 K en 100 K, manteniéndose la nueva temperatura durante 100 ps en cada etapa. Después del enfriamiento a 300 K, las conformaciones resultantes se almacenaron y se optimizaron, sin interrumpir la dinámica, por mecánica molecular imponiendo como criterio de convergencia $0.001 \text{ Kcal } \text{\AA}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ o un máximo de 965 ciclos. Los confórmeros resultantes se compararon entre sí con el fin de eliminar las que poseían una energía superior a 15 Kcal mol^{-1} con respecto al mínimo global, dando lugar finalmente a alrededor de 80 conformaciones de mínima energía para cada confórmero.

5.2. SÍNTESIS

5.2.1. MÉTODOS GENERALES

El seguimiento de las reacciones se efectuó por cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor. Los compuestos se detectaron con luz UV a 254 nm y/o mediante pulverización con disolución al 2% de ninhidrina en EtOH y posterior calefacción, o bien con disolución al 10 % de ácido fosfomolibdico en EtOH (100 mL).

Las separaciones cromatográficas en columna flash se realizaron con gel de sílice Merck 60 (230-400 mesh).

Las cromatografías radiales preparativas fueron llevadas a cabo en un cromatotrón Harrison Research modelo 8924, en placas circulares de vidrio, sobre las que se utilizó gel de sílice 60 PF254 con yeso, de 1 ó 2 mm de espesor.

Las separaciones cromatográficas en fase reversa se realizaron con cartuchos Discovery[®] DSC-18LT de 6 mL de volumen y 1 g de relleno, de la marca Supelco.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Reichert-Jung Kofler.

Los análisis elementales se realizaron en un analizador Heareus CHN-O-RAPID y se hallan en el rango ± 0.4 % respecto a los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares.

Los espectros de ¹H-RMN se registraron en espectrómetros Varian-INOVA 300 (300 MHz), Bruker-AVANCE 300 (300 MHz), Varian-INOVA 400 (400 MHz) o Varian Unity 500 (500 MHz). En aquellas muestras disueltas en CDCl₃ la señal del disolvente fue asignada a 7.26 ppm. Para las muestras disueltas en D₂O o en mezclas H₂O/D₂O (6:1,

v/v), la señal del disolvente fue asignada a 4.60 ppm. En aquellos compuestos cuyos espectros monodimensionales presentaban complejidad, la asignación de las diferentes señales de ^1H -RMN se realizó mediante experimentos de correlación homonuclear ^1H - ^1H gCOSY. Los experimentos 1D-NOESY se registraron a 400 MHz utilizando 2 s de tiempo de espera y 500 ms de tiempo de mezcla. Los valores de desplazamientos químicos se dan en unidades δ (ppm). Los valores de las constantes de acoplamiento vienen expresadas en hertzios (Hz). Las multiplicidades aparecen expresadas como s (singlete), d (doblete), t (tripleto), c (cuartete), m (multiplete), dd (doble doblete), ddd (doble doble doblete), AB (sistema AB), ABX (sistema ABX). Todos los compuestos lineales sintetizados en los Capítulos 3.2, 3.3 y 3.5 poseedores de enlace peptídico en torno al enlace $\text{AA}_n\text{-Pro}$ muestran rotamería *cis/trans*, siendo el rotámero *trans* el mayoritario y del que se indican sus datos de RMN. En el caso de los derivados procedentes de las sustituciones del residuo de prolina (Gly- AA_2 -Glu) se detallan los datos de ambos rotámeros para los análogos tripéptidos desprotegidos.

Los espectros de ^{13}C -RMN se registraron en espectrómetros Varian-INOVA 300 (75 MHz), Bruker-AVANCE 300 (75 MHz), Varian-INOVA 400 (100 MHz) o Varian Unity 500 (125 MHz), referenciando las muestras disueltas en CDCl_3 a 77.0 ppm, mientras que para las muestras en D_2O se utilizó como referencia interna dioxano, asignando su señal a 66.66 ppm. Las asignaciones de las diferentes señales de ^{13}C -RMN se realizaron mediante experimentos de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C de tipo gHSQC y/o gHMBC. Los valores de desplazamientos químicos se dan en unidades δ (ppm).

Los poderes rotatorios se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 141 MC, indicándose en cada caso la concentración c (1g/100 mL) y el disolvente empleado.

La Espectrometría de Masas de Electro spray fue realizada en un aparato Hewlett Packard 1100 MSD, en modo positivo y/o negativo, utilizando como portador metanol o bien mezcla metanol-acetonitrilo-ácido fórmico (1%). El flujo utilizado fue 0.5 mL/min, presión de nebulizador 40 psi, y la temperatura y flujo de gas de secado fueron 300 °C y 10 l/min respectivamente. En esta técnica los picos $[\text{M}+1]$ y $[\text{M}+\text{Na}]$ suelen ser las señales más frecuentes y abundantes en el modo positivo, y $[\text{M}-1]$ en el modo negativo. Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa (m/z) y los valores entre paréntesis corresponden a las intensidades relativas al pico base (100%).

Los cromatogramas registrados por HPLC-MS se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo WATERS AllianceHT 2695 en fase reversa con una columna XBridge™ C₁₈ (Waters) de dimensiones 2.1 mm x100 mm x 3.5 μm. Las muestras se analizaron utilizando una proporción de eluyentes A:B de 95:5, compuestos por la fase móvil A (H₂O + 0.1%Ac. fórmico) y la fase móvil B (ACN + 0.08% Ac fórmico), a un flujo de 0.25 mL/min y con un detector WATERS 2996 PDA. La detección de masas se realizó mediante el equipo Micromass ZQ de Waters acoplado al módulo de HPLC, optimizando el voltaje de cono para cada muestra y con detección por EM-MS positiva.

5.2.2. PROCEDENCIA DE PRODUCTOS COMERCIALES

Ácido acético glacial	SCHARLAU
Ácido D-tartárico	ALDRICH
Alcohol bencílico	ALDRICH
Bromoacetato de <i>terc</i> -butilo	ALDRICH
BOP	FLUKA
<i>i</i> -BuOH	SCHARLAU
Carbonato de bis(triclorometilo)	ALDRICH
Celita 545	SDS
CDCl ₃	SDS
Cl ₂ SO	ALDRICH
Cp ₂ ZrHCl	ALDRICH

DIC	FLUKA
Dicarbonato de di- <i>terc</i> butilo	ALDRICH
DIEA	FLUKA
DMAP	ALDRICH
D ₂ O	MERCK
Et ₃ N	SCHARLAU
HATU	FLUKA
Hidrocloreuro de <i>N</i> -metoxi- <i>N</i> -metilamina	ALDRICH
HCl 35%	PANREAC
HOBt	ALDRICH
H ₂ SO ₄ 95-98%	PANREAC
KHSO ₄	PANREAC
LiAlH ₄	FLUKA
Metilamina	ALDRICH
<i>N</i> -(2-bromoetil)carbamato de <i>terc</i> -butilo	FLUKA
NaBH ₄	FLUKA
NaBH ₃ CN	FLUKA
NaCl	PANREAC
Na ₂ CO ₃	PANREAC
NaH (suspensión al 60% en aceite mineral)	ALDRICH

NaHCO ₃	PANREAC
NaOH	PANREAC
Na ₂ SO ₄	PANREAC
Ni Raney	FLUKA
Pd (C) 10%	FLUKA
Pd(PPh ₃) ₄	ALDRICH
PhSiH ₃	FLUKA
Piperidina	FLUKA
(<i>R</i>)-Cl-MTPA	FLUKA
Resina Dowex (50Wx4-100 mesh)	FLUKA
Resina Dowex (50Wx8-400 mesh)	ALDRICH
Resina Fmoc-Gly- <i>p</i> -alcoxibencilo de poliestireno (100-200 mesh)	BACHEM
Resina H-Glu(¹ Bu)-2-Cloro-tritilo de poliestireno (200-400 mesh)	IRIS BIOTECH
TFA	FLUKA
TFE	ALDRICH
TMSCN	FLUKA
ZnCl ₂	ALDRICH

Todos los disolventes empleados fueron de grado comercial y se secaron y purificaron utilizando métodos estándar.

Los aminoácidos y derivados cuya síntesis no se describe, proceden de la casa BACHEM AG o NEOSYSTEM.

5.2.3. SÍNTESIS DE PRODUCTOS DE PARTIDA CONOCIDOS

Síntesis de H-dmT-OH (110):

En un matraz se disuelve 1.00 g de H-Cys-OH·HCl (6.30 mmol) en acetona anhidra (60 mL) y se deja reaccionar a reflujo durante 24 h bajo atmósfera inerte. Pasado este tiempo se filtra el precipitado resultante obteniendo el derivado de pseudoprolina **110** en altos rendimientos (1.24 g, 96%). *P.f.* 162-165 °C; *P.f.* lit.¹⁰⁹ 165-168 °C.

*Síntesis de H-dmP-OH (L-119):*⁹⁸

Sobre una disolución de Cp₂ZrHCl (3.10 g, 12.10 mmol) en THF (25 mL) enfriada a -20 °C se añade, gota a gota, una disolución de 5,5-dimetilpirrolidin-2-ona (1.00 g, 9.30 mmol), sintetizado previamente según el método descrito¹⁵¹, en 25 mL de THF, dejando la mezcla agitar durante 3 h alcanzando t.a. Pasado este tiempo se añade CNTMS (1.4 mL, 11.20 mmol) y se deja reaccionar durante una hora más. Se adicionan entonces 50 mL de HCl 6N, formándose una suspensión que se lava una vez con CH₂Cl₂ (25 mL), se extrae la fase acousa y se calienta a reflujo durante 12 h. Después de enfriar la mezcla de reacción, se lava con más CH₂Cl₂ (50 mL) y extrae la fase acuosa, eliminando posteriormente el H₂O a presión reducida. El residuo resultante se disuelve en 10 mL de H₂O y se purifica por columna de intercambio iónico, empleando una resina Dowex (50Wx8-400 mesh) y NH₄OH 1N como eluyente, obteniéndose la mezcla enantiomérica H-D,L-dmP-OH (**L,D-119**) (135 mg, 10%). *P.f.* 193-196 °C; *P.f.* lit.⁹⁸ 194-196 °C. Para resolver dicha mezcla se disuelven 110 mg (0.77 mmol) de **L,D-119** en 2 mL de H₂O y se añaden 115 mg (0.77 mmol) de ácido D-tartárico y 10 mL de EtOH gota a gota, dejando la mezcla agitar durante 24 h. Pasado este tiempo se filtra el precipitado formado y se lava con EtOH frío. Se disuelve el complejo resultante (48 mg) en 2 mL de H₂O y se purifica nuevamente por columna de intercambio iónico [Dowex (50Wx4-100 mesh), NH₄OH 1N] para obtener H-dmP-OH (**L-119**) enantioméricamente pura (25 mg, 45%). $[\alpha]_D^{20} = -50.8$ (c 0.9, H₂O); $[\alpha]_D^{20}$ lit.⁹⁷ = -51.2 (c 1, H₂O).

Procedimiento general para la síntesis de las N-metoxi-N-metilcarboxamidas derivadas de Boc-Pro-OH y Boc-Gly-OH:

A una disolución del correspondiente aminoácido *N*-protegido (15.00 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (25 mL) se adiciona sucesivamente hidrocloreuro de *N*-metoxi-*N*-metilamina (1.46 g, 15.00 mmol), DMAP (2.01 g, 16.50 mmol) y BOP (6.63 g, 15.00 mmol). Después de 18 h de agitación a temperatura ambiente, se lava sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (25 mL) y NaHCO₃ al 10% (25 mL) extrayendo con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) cada una de las fases acuosas. Se secan los extractos orgánicos sobre Na₂SO₄ anhidro, y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial utilizando como eluyente el indicado en cada caso. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las *N*-metoxi-*N*-metilcarboxamidas así obtenidas se detallan a continuación:

N-metoxi-*N*-metilcarboxamida derivada de Boc-Pro-OH (**137**): Aceite incoloro (93%); $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -12.5$ (c 1, CHCl₃); $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ lit.¹⁵² = -13.1 (c 1.1, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.59 (dd, 1H, *J* = 8.2 y 3.7, Pro-H_α), 3.72 (s, 3H, O-CH₃), 3.67-3.33 (m, 2H, Pro-H_β), 3.20 (s, 3H, N-CH₃), 2.31-1.72 (m, 4H, Pro-H_β, Pro-H_γ), 1.41 (s, 9H, ^tBu).

N-metoxi-*N*-metilcarboxamida derivada de Boc-Gly-OH: Sólido blanco (90%); *P.f.* 75-78 °C; *P.f.* lit.¹⁵³ 77-78 °C; ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.25 (m, 1H, NH), 4.08 (d, 2H, *J* = 4.7, Gly-H_α), 3.71 (s, 3H, O-CH₃), 3.20 (s, 3H, N-CH₃), 1.45 (s, 9H, ^tBu).

Procedimiento para la síntesis de los α-aminoaldehídos Boc-Pro-H y Boc-Gly-H:

Sobre una disolución de la *N*-metoxi-*N*-metilcarboxamida derivada de Boc-Pro-OH o Boc-Gly-OH (4.30 mmol) en THF anhidro (30 mL), enfriada a -30 °C, se adiciona, lentamente y bajo atmósfera de argón, LiAlH₄ (6.52 mmol). La evolución de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina, y, una vez consumida la carboxamida de partida, el exceso de hidruro se destruye con disolución de KHSO₄ (1.61 mmol) en H₂O (10 mL).

A continuación, se añade éter dietílico (30 mL), y se mantiene la agitación hasta que la mezcla adquiere temperatura ambiente. De este modo, se obtienen dos fases, una acuosa y otra etérea. La fase acuosa se extrae con más éter dietílico (50 mL) y los extractos orgánicos conjuntos se lavan sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (50 mL) y disolución saturada de NaHCO₃ (50 mL). Finalmente, la disolución se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, y se evapora el disolvente a sequedad a temperatura ambiente obteniendo el α -aminoaldehído correspondiente que se utiliza en la siguiente etapa de síntesis sin purificación adicional. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los α -aminoaldehídos así obtenidos se detallan a continuación:

*Boc-Pro-H (138)*¹⁵⁴: Aceite incoloro (93%); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.45 (s, 1H, CHO), 4.04 (m, 1H, Pro-H _{α}), 3.60-3.30 (m, 2H, Pro-H _{δ}), 2.11 (m, 1H, Pro-H _{β}), 1.96 (m, 1H, Pro-H _{β}), 1.91-1.85 (m, 2H, Pro-H _{γ}), 1.42 (s, 9H, ^tBu).

*Boc-Gly-H (144)*¹⁵³: Aceite incoloro (34%); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.63 (s, 1H, CHO), 5.10 (m, 1H, NH), 4.06 (d, 2H, J = 5.1, Gly-H _{α}), 1.44 (s, 9H, ^tBu).

Z-Pro-Glu(O^tBu)-O^tBu:

A una disolución de H-Glu(O^tBu)-O^tBu-HCl (808 mg, 2.73 mmol) y DIEA (983 μ L, 5.74 mmol) en 15 mL de CH₂Cl₂ se adiciona sucesivamente Z-Pro-OH (749.5 mg, 3.01 mmol) y BOP (1.32 g, 3.01 mmol), y se deja reaccionar durante 18 h. Pasado este tiempo la reacción se lava sucesivamente con una disolución de ácido cítrico (10%) y NaHCO₃ (10%) extrayendo con CH₂Cl₂ (3 x 15 mL) cada una de las fases acuosas. Se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro, y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente Hexano/AcOEt (3:2) para obtener el dipéptido Z-Pro-Glu(O^tBu)-O^tBu en un 99% de rendimiento como un aceite incoloro (1.32 g). $[\alpha]_D^{20}$ = -43.0 (c 1.1, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.43-7.27 (m, 5H, Ph), 7.11 (m, 1H, Glu-NH), 5.17 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.41 (m, 1H, Glu-H _{α}), 4.31 (m, 1H, Pro-H _{α}), 3.63-3.40 (m, 2H, Pro-H _{δ}),

2.34-1.78 (m, 8H, 2Pro-H_γ, 2Pro-H_β, 2Glu-H_β, 2Glu-H_γ), 1.44 (s, 18H, ^tBu); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.1 (Glu-CO_γ), 171.4 (Glu-CO_α), 170.7 (Pro-CO), 156.0 (Boc-CO), 136.5 (Ph-C₁), 128.4 (Ph), 128.0 (Ph), 127.9 (Ph), 82.1 y 80.5 (C-(CH₃)₃), 67.3 (CH₂-Ph), 60.5 (Pro-C_α), 52.3 (Glu-C_α), 47.4 (Pro-C_δ), 31.4 (Glu-C_γ), 28.6 (Pro-C_β), 28.0 y 27.9 (C-(CH₃)₃), 27.7 (Glu-C_β), 24.5 (Pro-C_γ); **EM-ES** (m/z): 513 (100) [M⁺+Na], 491 (52) [M⁺+1]. **Análisis elemental** calculado para C₂₆H₃₈N₂O₇ (%): C 63.65, H 7.81, N 5.71. Encontrado (%): C 63.44, H 8.06, N 5.48.

H-Pro-Glu(O^tBu)-O^tBu (145):

A una disolución del dipéptido protegido Z-Pro-Glu(O^tBu)-O^tBu (1.31 g, 2.66 mmol) en 15 mL de MeOH se le añade un 10% en peso de Pd (C) al 10% (13 mg) y se deja reaccionar bajo atmósfera de H₂ a t.a. y 15 p.s.i. durante 2.5 h. Pasado este tiempo se elimina la atmósfera de H₂, se filtra el catalizador por celita, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se disuelve en H₂O y se liofiliza obteniendo cuantitativamente el dipéptido desprotegido **145** como un sólido blanco (948 mg, 99%). **P.f.** 87-90 °C (MeOH/Et₂O); [α]_D²⁰ = -47.0 (c 1.1, MeOH); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.07 (d, 1H, *J* = 8.5, Glu-NH), 4.45 (ddd, 1H, *J* = 8.5, 8.5 y 4.8, Glu-H_α), 3.74 (dd, 1H, *J* = 9.2 y 5.3, Pro-H_α), 3.06-2.89 (m, 2H, Pro-H_δ), 2.35-2.06 (m, 4H, Pro-H_β, Glu-H_β, 2Glu-H_γ), 1.95-1.81 (m, 2H, Pro-H_β, Glu-H_β), 1.74-1.68 (m, 2H, Pro-H_γ), 1.46 (s, 9H, ^tBu), 1.43 (s, 9H, ^tBu); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.2 (Pro-CO), 171.9 (Glu-CO_γ), 171.2 (Glu-CO_α), 81.9 y 81.7 (C-(CH₃)₃), 60.4 (Pro-C_α), 51.3 (Glu-C_α), 47.2 (Pro-C_δ), 31.4 (Glu-C_γ), 30.9 (Pro-C_β), 28.0 (Glu-C_β), 27.9 y 27.9 (C-(CH₃)₃), 26.1 (Pro-C_γ); **EM-ES** (m/z): 357 (100) [M⁺+1].

Formación de los ésteres metílicos derivados de H-P^{Me}-OH y H-dmP-OH:

Sobre una disolución del correspondiente aminoácido desprotegido (H-P^{Me}-OH o H-dmP-OH) (0.30 mmol) en 3 mL de MeOH enfriada a 0 °C se añade Cl₂SO (90 mmol) y se deja reaccionar durante 5 días a temperatura ambiente. Finalmente se elimina el disolvente a presión reducida obteniendo el éster metílico correspondiente sin necesidad

de purificación adicional. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos compuestos se detallan a continuación:

*H-P^{Me}-OMe-HCl (163)*¹⁵⁵: Sólido blanco (86%). **P.f.** 133-135 °C; $[\alpha]_D^{20} = -58.8$ (c 1, CHCl₃); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.85 (s, 3H, OMe), 3.61-3.55 (m, 2H, P^{Me}-H_δ), 2.39 (m, 1H, P^{Me}-H_β), 2.22-1.89 (m, 3H, P^{Me}-H_β, 2P^{Me}-H_γ), 1.85 (s, 3H, CH₃); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.9 (P^{Me}-CO), 68.6 (P^{Me}-C_α), 53.5 (OMe), 45.0 (P^{Me}-C_δ), 35.7 (P^{Me}-C_β), 22.4 (P^{Me}-C_γ), 21.1 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 144 (100) [M⁺+1].

*H-dmP-OMe-HCl (164)*¹⁵⁶: Sólido amorfo (95%). $[\alpha]_D^{20} = -20.9$ (c 1, CHCl₃); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.62 (t, 1H, *J* = 8.4, dmP-H_α), 3.79 (s, 3H, OMe), 2.47 (m, 1H, dmP-H_β), 2.22 (m, 1H, dmP-H_β), 2.06-1.84 (m, 2H, dmP-H_γ), 1.66 (s, 3H, CH₃), 1.52 (s, 3H, CH₃); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.6 (dmP-CO), 66.4 (dmP-C_δ), 58.4 (dmP-C_α), 53.4 (OMe), 37.7 (dmP-C_γ), 27.4 (dmP-C_β), 25.4 (CH₃), 25.2 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 158 (100) [M⁺+1].

5.2.4. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE SÍNTESIS

5.2.4.1. Síntesis de péptidos en fase sólida

La síntesis en fase sólida de los productos descritos en este trabajo se ha realizado en jeringuillas de polipropileno de 10 mL provistas de un filtro de polietileno poroso. Los reactivos y disolventes se añaden a la jeringuilla de manera que permitan un adecuado hinchamiento de la resina. La mezcla se agita con una varilla de teflón y al final de cada tratamiento se elimina el disolvente, los excesos de reactivos y los subproductos que se

encuentren en disolución, por filtración a través de un sistema conectado a una trompa de vacío.

Para la síntesis de análogos de GPE **14-20** en fase sólida se ha empleado como soporte polimérico una resina H-Glu(^tBu)-2-Cloro-tritilo, mientras que para la preparación del dipéptido **176** se ha utilizado una resina tipo Wang Fmoc-Gly-*p*-alcoxibencilo, ambas de poliestireno. Antes de iniciar la síntesis se realiza un acondicionamiento previo con objeto de lavar e hinchar la resina a emplear mediante lavados de DCM/DMF de un minuto cada uno. Este proceso se repite tres veces.

El crecimiento de la cadena peptídica se realiza manualmente según el protocolo general de síntesis Fmoc/^tBu. Las reacciones de acoplamiento fueron monitorizadas mediante el test de Kaiser para aminas primarias o el test de cloranilo para aminas secundarias¹⁰⁴.

La purificación de los análogos desprotegidos obtenidos por este método se han llevado a cabo mediante cromatografía en fase reversa utilizando como eluyente un gradiente de Acetonitrilo en Agua (0-10%).

Procedimiento general de acoplamiento:

En un vial se disuelven 0.30 mmol del correspondiente aminoácido *N*-protegido y 0.30 mmol de HOBt en DMF anhidra (1 mL) y se añaden 0.30 mmol de DIC, dejándolo agitar durante 10 min. La mezcla resultante se añade a una jeringa con 0.10 mmol de resina hinchada previamente y se deja reaccionar a t.a. durante 18 h. Tras este tiempo se elimina el exceso de reactivos mediante lavados de DMF/DCM/DMF/DCM (4 x 0.5 min.).

Procedimiento general para la eliminación del grupo protector Fmoc:

La peptidil-resina correspondiente *N*-protegida con el grupo Fmoc se trata con una disolución de piperidina en DMF al 20% (1 x 1 min.) y (3 x 10 min.). Pasado este tiempo se lava con DMF/DCM/DMF/DCM (4 x 0.5 min.) dejando la resina acondicionada para la posterior operación de acoplamiento o desanclaje del producto.

Procedimiento para la eliminación del grupo protector Alloc del derivado de Ahc 93:

A la peptidil-resina *N*-protegida con el grupo Alloc **93** (0.30 mmol), bajo atmósfera de Ar, se adiciona CH₂Cl₂ (1 mL) y PhSiH₃ (924 µL, 25 eq.). Tras 5 minutos se añade una disolución de Pd(PPh₃)₄ (34 mg, 0.1 eq.) en CH₂Cl₂ anhidro (1 mL) y la mezcla de reacción se deja reaccionar durante 1.5 h. Transcurrido este tiempo se seca y lava la resina con CH₂Cl₂ (4 x 1 min.) y se repite de nuevo el procedimiento de desprotección dejándolo reaccionar durante 30 min. Finalmente se lava la resina con DCM/dioxano-agua (9:1)/DMF/DCM (4 x 1 min.) para obtener la peptidil resina *N*-desprotegida **101**.

Procedimiento general para el desanclaje de los tripéptidos de la resina:

Se trata la correspondiente resina con el producto a desanclar **50-56** ó **94-101** (0.30 mmol) con 1.5 mL de una mezcla de AcOH/TFE/DCM (1:1:8) a t.a. durante 3h. Pasado este tiempo se lava la resina con CH₂Cl₂ (3 x 3 mL) recogiendo los lavados en un matraz. Se elimina el disolvente a presión reducida y la mezcla resultante se liofiliza para dar los correspondientes *terc*-butil-éster derivados **57-63** y **102-109**.

Procedimiento general para la eliminación de los ésteres terc-butílicos:

Al correspondiente derivado protegido como éster *terc*-butílico **57-59**, **61-64** ó **102-109** (0.15 mmol) disuelto en 3 mL de CH₂Cl₂ se le añaden 400 µL de TFA y se deja reaccionar a t.a. durante 18 h. Transcurrido este tiempo el disolvente se evapora a sequedad añadiendo más CH₂Cl₂ (3 x 2 mL) para eliminar las trazas de TFA y se liofiliza para dar los análogos desprotegidos correspondientes **14-20** y **30-37**.

5.2.4.2. Síntesis de péptidos en disolución***Procedimiento general de acoplamiento:***

En un matraz se disuelven 0.30 mmol del correspondiente aminoácido *N*-desprotegido en 5 mL de CH₂Cl₂ y se adiciona sucesivamente el siguiente aminoácido a acoplar *C*-desprotegido (0.36 mmol), BOP (0.36 mmol) y DIEA o Et₃N (0.66 mmol), dejándolo reaccionar durante 18 horas. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se lava

sucesivamente con una disolución de ácido cítrico (10%) y NaHCO_3 (10%) extrayendo con CH_2Cl_2 (3 x 2 mL) cada una de las fases acuosas. Se juntan los extractos orgánicos, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial utilizando como eluyente el indicado en cada caso.

Procedimiento general para la eliminación del grupo protector Boc:

Se disuelve el péptido correspondiente *N*-Boc protegido (0.30 mmol) en una disolución de HCl burbujeado en AcOEt 3.2M (4 mL) y se deja reaccionar a t.a. durante 2 horas. Se elimina entonces el disolvente a presión reducida añadiendo CH_2Cl_2 (3 x 2 mL) para eliminar las trazas de HCl y el residuo resultante se liofiliza obteniendo el correspondiente derivado *N*-desprotegido sin necesidad de purificación adicional.

Procedimiento general de eliminación de grupos protectores Z y Bn:

A una disolución del compuesto Z y/o Bn-protegido correspondiente (0.15 mmol) en 15 mL de MeOH se le añade un 25% en peso de Pd (C) al 10% y se deja reaccionar bajo atmósfera de H_2 a t.a. y 20 p.s.i. durante el tiempo indicado en cada caso. Pasado este tiempo se elimina la atmósfera de H_2 , se filtra el catalizador por celita, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se disuelve en H_2O y se liofiliza dando lugar a los correspondientes derivados desprotegidos cuantitativamente. En caso de ser necesario, el derivado obtenido se purifica según se indique en cada caso.

Procedimiento general para la eliminación conjunta de los grupos protectores Boc y ésteres terc-butílicos:

Al correspondiente derivado protegido como Boc y éster *terc*-butílico (0.15 mmol) disuelto en 5 mL de CH_2Cl_2 se le añaden 850 μL de TFA y se deja reaccionar a t.a. durante el tiempo indicado en cada caso. Transcurrido este tiempo el disolvente se evapora a sequedad añadiendo CH_2Cl_2 (3 x 2 mL) para eliminar las trazas de TFA y se liofiliza para dar los análogos desprotegidos correspondientes. En caso de ser necesario, el derivado obtenido se purifica según se indique en cada caso.

5.2.5. SÍNTESIS DE TRIPÉPTIDOS

5.2.5.1. Síntesis de AA₁-Pro-Glu

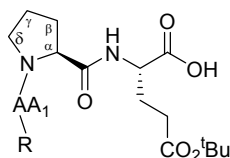
a) Síntesis en fase sólida

Mediante los procedimientos generales descritos anteriormente de síntesis en fase sólida, se han sintetizado los análogos **14-20** siguiendo el Esquema 3.1. Los aminoácidos protegidos P-AA₁-OH que se han utilizado son: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Boc-Asp(OBn)-OH, Boc-Lys(Boc)-OH, Boc-Nle-OH y Boc-Ile-OH. Los análogos desprotegidos **14-20** fueron purificados por cromatografía en fase reversa utilizando como eluyente un gradiente de Acetonitrilo en Agua (0-10%). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos tanto de estos tripéptidos como de sus correspondientes intermedios protegidos **57-59** y **61-64**, se recogen en las Tablas 5.1 y 5.2.

Boc-Asp-Pro-Glu(O^tBu)-OH (64):

A una disolución del derivado de Asp protegido en forma de éster bencílico **60** (96 mg, 0.16 mmol) en 5 mL de MeOH se le añade Pd (C) al 10% (10 mg) y se deja reaccionar bajo atmósfera de H₂ a t.a. durante 30 min. Pasado este tiempo se filtra el catalizador, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se disuelve en H₂O y se liofiliza para obtener 72 mg (88%) del *terc*-butil-éster derivado **64** como un sólido blanco sin necesidad de purificación adicional. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos se recogen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los tripéptidos protegidos **57**-**64** de fórmula general AA₁-Pro-Glu.



	57	58	59	60
AA ₁	Ala	D-Ala	Phe	Asp(OBn)
R	H	H	H	Boc
Rdto. (%)	98	98	99	88
P. f. (°C) ^a	126-129	117-120	153-156	Aceite
[α] _D ²⁰	-47.8	-45.6	-18.7	-61.8
	(c 1, MeOH)	(c 1.1, MeOH)	(c 1.1, MeOH)	(c 0.6, MeOH)
EM-ES (m/z)	372 [M ⁺ +1]	372 [M ⁺ +1]	448 [M ⁺ +1]	516 [M ⁺ +1]
¹ H-RMN ^{b, c}				
AA₁				
H _α	4.15 (c, 7.1)	4.16 (c, 6.8)	3.82 (m)	4.86 (m)
H _β	1.33 (d, 7.1)	1.28 (d, 6.8)	3.49 (dd, -12.4, 4.1) y 2.84 (t, 12.2)	3.04 (dd, -17.1, 10.7) y 2.75 (dd, -17.1, 4.2)
Pro				
H _α	4.27 (dd, 8.0, 6.0)	4.24 (dd, 8.6, 3.4)	3.44 (m)	4.65 (dd, 8.8, 2.6)
H _δ	3.50 y 3.43 (m)	3.54 y 3.41 (m)	3.87 y 3.40 (m)	4.00-3.91 (m)
Glu				
NH	7.85 (d, 7.6)	7.84 (d, 7.6)	7.19 (m)	7.37 (d, 7.6)
H _α	3.98 (ddd, 8.6, 7.6, 5.1)	3.97 (ddd, 9.0, 7.6, 5.0)	4.67 (dt, 9.8, 3.9)	4.44 (m)
H _β	1.89 y 1.69 (m)	1.87 y 1.68 (m)	2.35 y 2.12 (m)	2.13 y 2.01 (m)
H _γ	2.16 (t, 7.5)	2.14-2.07 (m)	2.47 y 2.30 (m)	2.37-2.27 (m)
¹³ C-RMN ^b				
AA₁				
C _α	48.2	48.4	52.5	47.9
C _β	15.2	14.9	38.7	37.2
Pro				
C _α	60.7	61.0	61.7	60.8
C _δ	47.8	47.7	47.7	47.8
Glu				
C _α	54.3	54.6	53.1	52.0
C _β	27.1	27.4	28.7	26.9
C _γ	31.8	31.9	32.9	31.9

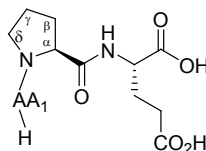
a) Compuestos recrystalizados en MeOH/Et₂O. b) Espectros realizados en muestras disueltas en H₂O/D₂O a 500 MHz para ¹H-RMN y 125 MHz para ¹³C-RMN, excepto para **59** (CDCl₃) y **60** (CDCl₃, 300 MHz). Valores de desplazamiento químico en ppm. c) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz).

Tabla 5.1. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los tripéptidos protegidos **57-64** de fórmula general AA₁-Pro-Glu (Continuación).

	61	62	63	64
AA ₁	Lys(Boc)	Nle	Ile	Asp
R	Boc	Boc	Boc	Boc
Rdto. (%)	99	98	98	95
P.f. (°C) ^a	Aceite	Aceite	Aceite	86-89
[α] ²⁰ _D	-29.7	-52.7	-62.4	-45.2
EM-ES (m/z)	(c 0.9, MeOH) 629 [M ⁺ +1]	(c 0.6, MeOH) 514 [M ⁺ +1]	(c 0.6, MeOH) 514 [M ⁺ +1]	(c 0.6, MeOH) 606 [M ⁺ +1]
¹H-RMN^{b, c}				
AA₁				
H _α	4.56 (m)	4.41 (m)	4.29 (t, 8.7)	4.81 (m)
H _β	1.98 (m)	1.63 (m)	1.76 (m)	3.05 (dd, -16.5, 9.7) y 2.70 (dd, -16.5, 4.4)
H _γ	1.41 (m)	1.39 (m)	1.58 y 1.15 (m)	
H _δ	1.43 (m)	1.26 (m)	0.88 (t, 7.3)	
H _ω	3.08 (m)	0.89 (t, 6.7)	0.95 (d, 6.6) ^d	
Pro				
H _α	4.50 (m)	4.59 (dd, 7.8, 3.8)	4.60 (dd, 7.8 y 3.7)	4.56 (dd, 7.7, 4.5)
H _δ	3.73-3.67 (m)	3.75 y 3.68 (m)	3.83 y 3.63 (m)	3.85-3.77 (m)
Glu				
NH	6.81 (d, 6.1)	7.48 (d, 7.1)	7.63 (d, 7.1)	7.40 (m)
H _α	4.43 (m)	4.46 (m)	4.51 (m)	4.49 (m)
H _β	2.05 (m)	1.98 (m)	2.33 y 2.00 (m)	2.14 (m)
H _γ	2.36-2.28 (m)	2.37-2.30 (m)	2.43-2.34 (m)	2.38-2.29 (m)
¹³C-RMN^b				
AA₁				
C _α	51.6	51.9	56.4	48.2
C _β	31.4	32.3	37.6	37.4
C _γ	21.7	27.4	24.4	
C _δ	29.1	22.3	11.0	
C _ω	41.3	13.9	15.4 ^d	
Pro				
C _α	61.5	60.2	60.3	61.1
C _δ	47.5	47.5	48.0	47.7
Glu				
C _α	52.0	52.2	52.2	52.1
C _β	27.5	27.2	25.1	26.4
C _γ	32.4	31.6	31.6	31.9

a) Compuestos recristalizados en MeOH/Et₂O. b) Espectros realizados en muestras disueltas en CDCl₃ a 300 MHz para ¹H-RMN y 75 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. c) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). d) Desplazamiento químico para el Me en posición β.

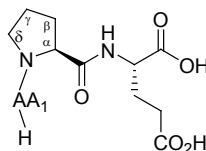
Tabla 5.2. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los tripéptidos desprotegidos **14-20** de fórmula general AA₁-Pro-Glu.



	14	15	16	17
AA ₁	Ala	D-Ala	Phe	Asp
Rdto. (%)	78	93	98	88
P.f. (°C) ^a	52-55 ^d	91-94 ^e	Espuma	Sólido céreo
[α] ²⁰ _D	-39.1	-47.3	-16.6	-40.6
	(c 1, MeOH) ^d	(c 1, MeOH) ^e	(c 1, MeOH)	(c 1, MeOH)
EM-ES (m/z)	316 [M ⁺ +1]	316 [M ⁺ +1]	392 [M ⁺ +1]	360 [M ⁺ +1]
¹H-RMN^{b, c}				
AA₁				
H _α	4.12 (m)	4.13 (c, 7.0)	4.34 (dd, 7.6, 5.7)	4.42 (dd, 8.8, 3.9)
H _β	1.29 (d, 7.0)	1.25 (d, 7.0)	3.13 (dd, -14.6, 5.7) y 2.88 (dd, -14.6, 7.6)	2.89 (dd, -18.1, 3.9) y 2.67 (dd, -18.1, 9.1)
Pro				
H _α	4.25 (t, 7.0)	4.23 (dd, 8.5, 3.4)	4.30 (m)	4.29 (dd, 8.1, 6.1)
H _δ	3.47 y 3.38 (m)	3.49 y 3.38 (m)	3.53 y 3.23 (m)	3.54-3.45 (m)
Glu				
NH	8.30 (d, 6.7)	7.38 (d, 7.7)	8.28 (d, 7.0)	8.24 (d, 7.5)
H _α	4.14 (m)	4.18 (ddd, 9.1, 7.7, 5.1)	4.20 (dd, 8.9, 5.3)	4.18 (ddd, 9.3, 7.5, 5.4)
H _β	1.97 y 1.77 (m)	1.98 y 1.78 (m)	2.01 y 1.80 (m)	1.99 y 1.80 (m)
H _γ	2.29 (t, 7.4)	2.30 (t, 7.5)	2.31 (t, 7.5)	2.30 (t, 7.3)
¹³C-RMN^b				
AA₁				
C _α	48.1	48.0	53.3	48.9
C _β	15.1	14.6	35.7	34.2
Pro				
C _α	60.5	60.4	60.7	60.8
C _β	47.8	47.4	48.0	48.0
Glu				
C _α	52.5	51.9	53.2	52.3
C _β	25.9	25.5	26.4	25.9
C _γ	30.1	29.7	30.2	30.1

a) Compuestos recrystalizados en MeOH/Et₂O. b) Espectros realizados en muestras disueltas en H₂O/D₂O a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN, excepto para **16** (300 MHz) y **17** (500 MHz). Valores de desplazamiento químico en ppm. c) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). d) P.f. lit.^{102b}= 51-53 °C; [α]²⁰_D lit.^{102b}= -43.0 (c 0.05, MeOH). e) P.f. lit.^{102b}= 89-93 °C; [α]²⁰_D lit.^{102b}= -49.1 (c 0.05, MeOH).

Tabla 5.2. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los tripéptidos desprotegidos **14-20** de fórmula general AA₁-Pro-Glu (Continuación).



	18	19	20
AA ₁	Lys	Nle	Ile
Rdto. (%)	93	86	85
<i>P.f.</i> (°C) ^a	Espuma	Sólido céreo	Sólido céreo
$[\alpha]_D^{20}$	-24.7 (c 1, MeOH)	-37.8 (c 1, MeOH)	-37.0 (c 1, MeOH)
EM-ES (m/z)	373 [M ⁺ +1]	358 [M ⁺ +1]	358 [M ⁺ +1]
¹H-RMN^{b, c}			
AA₁			
H _α	4.14 (m)	4.09 (t, 5.9)	3.97 (d, 5.4)
H _β	1.72 (m)	1.68 (m)	1.81 (m)
H _γ	1.26 (m)	1.16 (m)	1.27 y 0.95 (m)
H _δ	1.48 (m)	1.14 (m)	0.68 (t, 7.3)
H _ω	2.78 (m)	0.66 (t, 7.2)	0.84 (d, 7.3) ^d
Pro			
H _α	4.27 (dd, 6.1, 8.2)	4.26 (t, 7.2)	4.26 (t, 7.3)
H _δ	3.51 y 3.38 (m)	3.50 y 3.38 (m)	3.52 y 3.39 (m)
Glu			
NH	8.39 (d, 7.3)	8.31 (d, 7.0)	8.31 (d, 7.6)
H _α	4.18 (ddd, 9.1, 7.3, 4.8)	4.19 (ddd, 9.2, 7.0, 5.4)	4.18 (ddd, 9.3, 7.6, 4.9)
H _β	1.99 y 1.77 (m)	2.99 y 1.78 (m)	2.98 y 1.77 (m)
H _γ	2.31 (t, 7.4)	2.31 (t, 7.3)	2.30 (t, 7.3)
¹³C-RMN^b			
AA₁			
C _α	51.8	52.2	56.6
C _β	29.5	29.5	35.6
C _γ	20.7	26.0	23.1
C _δ	26.7	21.6	10.4
C _ω	39.4	13.0	14.4 ^d
Pro			
C _α	60.6	60.4	60.7
C _β	48.1	48.0	48.4
Glu			
C _α	52.3	52.3	52.2
C _β	25.9	25.9	25.9
C _γ	30.0	29.8	29.8

a) Compuestos recristalizados en MeOH/Et₂O. b) Espectros realizados en muestras disueltas en H₂O/D₂O a 500 MHz para ¹H-RMN y 125 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. c) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). d) Desplazamiento químico para el Me en posición β.

b) Síntesis en disolución

Mediante los procedimientos generales descritos anteriormente de síntesis en disolución, se han sintetizado los análogos **21** y **22** siguiendo los Esquemas 3.2 y 3.3. Los datos analíticos y espectroscópicos de ambos así como los de sus correspondientes intermedios se recogen a continuación.

Boc-Pro-Glu(OBn)-OBn (65)^{102b}:

Se obtiene por reacción de acoplamiento entre Boc-Pro-OH y H-Glu(OBn)-OBn·HCl siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en AcOEt/Hexano (2:1) para dar **65** como un aceite incoloro (97%). $[\alpha]^{20}_D = -44.5$ (c 1.1, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.40-7.24 (m, 10H, 2Ph), 6.77 (m, 1H, Glu-NH), 5.15 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.62 (m, 1H, Glu-H_α), 4.22 (m, 1H, Pro-H_α), 3.49-3.25 (m, 2H, Pro-H_δ), 2.44-2.10 (m, 3H, Pro-H_β, 2Glu-H_γ), 2.22 (m, 1H, Glu-H_β), 1.99 (m, 1H, Glu-H_β), 1.94-1.75 (m, 3H, Pro-H_β, 2Pro-H_γ), 1.42 (s, 9H, ^tBu); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.4 (Pro-CO), 172.4 (Glu-CO_γ), 171.4 (Glu-CO_α), 156.7 (Boc-CO), 135.6 y 135.2 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.4 (Ph), 128.2 (Ph), 80.8 (C-(CH₃)₃), 67.2 y 66.4 (CH₂-Ph), 59.8 (Pro-C_α), 51.5 (Glu-C_α), 47.0 (Pro-C_δ), 30.0 (Glu-C_γ), 30.0 (Pro-C_β), 28.2 (C-(CH₃)₃), 27.4 (Glu-C_β), 24.6 (Pro-C_γ); **EM-ES** (m/z): 547 (29) [M⁺+Na], 525 (100) [M⁺+1].

H-Pro-Glu(OBn)-OBn·HCl (66)^{102b}:

Se obtiene por tratamiento de **65** con una disolución HCl burbujeado en AcOEt 3.2M, siguiendo el procedimiento general descrito con anterioridad, como un aceite tras liofilizar (98%). $[\alpha]^{20}_D = -40.6$ (c 1.3, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.70 (m, 1H, Glu-NH), 7.40-7.21 (m, 10H, 2Ph), 5.14 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.06 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.52 (m, 1H, Glu-H_α), 3.92 (m, 1H, Pro-H_α), 3.55-3.19 (m, 2H, Pro-H_δ), 2.68-2.36 (m, 3H, Pro-H_β, 2Glu-H_γ), 2.32-2.09 (m, 2H, Pro-H_β, Glu-H_β), 2.06-1.87 (m, 2H, Pro-H_γ), 1.80 (m, 1H, Glu-H_β); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.7 (Pro-CO), 170.7 (Glu-

CO_γ), 169.0 (Glu-CO_α), 135.6 y 135.1 (Ph-C₁), 128.5 (Ph), 128.4 (Ph), 128.3 (Ph), 128.2 (Ph), 67.3 y 66.7 (CH₂-Ph), 60.1 (Pro-C_α), 52.7 (Glu-C_α), 47.4 (Pro-C_δ), 30.9 (Glu-C_γ), 30.9 (Pro-C_β), 26.2 (Glu-C_β), 24.6 (Pro-C_γ); **EM-ES** (m/z): 425 (100) [M⁺+1].

Ac-Gly-Pro-Glu(OBn)-OBn (67):

Se obtiene por reacción de acoplamiento entre Ac-Gly-OH y H-Pro-Glu(OBn)-OBn (**66**) siguiendo el protocolo de acoplamiento descrito anteriormente. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en DCM/MeOH (20:1) para dar **67** como un sólido blanco (63%). **P.f.** 98-101 °C (MeOH/Et₂O); [α]²⁰_D = -52.4 (c 1, CHCl₃); ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.35-7.28 (m, 10H, 2Ph), 7.26 (d, 1H, *J* = 7.8, Glu-NH), 6.52 (m, 1H, Gly-NH), 5.14 y 5.11 (sist. AB, 2H, *J* = -12.2, CH₂-Ph), 5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.56 (m, 1H, Glu-H_α), 4.49 (dd, 1H, *J* = 8.1 y 3.2, Pro-H_α), 4.10 y 3.94 (sist. ABX, 2H, *J* = -17.7, 4.6 y 3.7, Gly-H_α), 3.51 (m, 1H, Pro-H_δ), 3.39 (m, 1H, Pro-H_δ), 2.39 (m, 2H, Glu-H_γ), 2.25-2.14 (m, 2H, Pro-H_β, Glu-H_β), 2.10-1.98 (m, 2H, Pro-H_γ, Glu-H_β), 1.95 (s, 3H, CH₃), 1.97-1.88 (m, 2H, Pro-H_β, Pro-H_γ); ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.7 (Glu-CO_γ), 171.3 (Glu-CO_α), 170.9 (Pro-CO), 170.2 (CH₃-C=O), 168.0 (Gly-CO), 135.6 y 135.1 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.4 (Ph), 128.2 (Ph), 128.2 (Ph), 128.1 (Ph), 67.2 y 66.5 (CH₂-Ph), 60.1 (Pro-C_α), 51.8 (Glu-C_α), 46.3 (Pro-C_δ), 42.1 (Gly-C_α), 30.1 (Glu-C_γ), 27.9 (Pro-C_β), 26.9 (Glu-C_β), 24.7 (Pro-C_γ), 22.8 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 547 (49) [M⁺+Na], 524 (100) [M⁺+1].

Ac-Gly-Pro-Glu-OH (21):

Se obtiene por reacción de hidrogenólisis de **67** durante 3 h, siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente, para obtener el análogo **21** como un sólido blanco (94%). **P.f.** 171-174 °C (MeOH/Et₂O); [α]²⁰_D = -75.3 (c 1, MeOH); ¹H-RMN (500 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 8.17 (d, 1H, *J* = 7.7, Glu-NH), 7.99 (t, 1H, *J* = 4.4, Gly-NH), 4.31 (dd, 1H, *J* = 8.1 y 4.4, Pro-H_α), 4.20 (m, 1H, Glu-H_α), 4.00 y 3.89 (sist. ABX, 2H, *J* = -17.2, 6.0 y 4.4, Gly-H_α), 3.51-3.45 (m, 2H, Pro-H_δ), 2.34 (t, 2H, *J* = 6.3, Glu-H_γ), 2.13 (m, 1H, Pro-H_β), 2.04 (m, 1H, Glu-H_β), 1.91 (s, 3H, CH₃), 1.92-1.85 (m, 2H, Pro-H_γ), 1.85 (m, 1H, Pro-H_β), 1.84 (m, 1H, Glu-H_β); ¹³C-RMN (125 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm):

177.8 (Glu-CO γ), 176.2 (Glu-CO α), 174.9 (CH $_3$ -C=O), 174.5 (Pro-CO), 169.6 (Gly-CO), 60.8 (Pro-C α), 53.3 (Glu-C α), 47.2 (Pro-C δ), 42.1 (Gly-C α), 30.6 (Glu-C γ), 29.5 (Pro-C β), 26.6 (Glu-C β), 24.6 (Pro-C γ), 21.9 (CH $_3$); **EM-ES** (m/z): 366 (100) [M $^+$ +Na], 344 (82) [M $^+$ +1].

Ac-Pro-Glu(OBn)-OBn (68):

Se obtiene por reacción de acoplamiento entre Ac-Pro-OH y H-Glu(OBn)-OBn·HCl siguiendo el protocolo general descrito con anterioridad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en AcOEt/Hexano (1:2) para dar **68** como un sólido blanco (62%). **P.f.** 93-96 °C; [α] $^{20}_D$ = -55.6 (c 0.9, CHCl $_3$); **1H -RMN** (300 MHz, CDCl $_3$) δ (ppm): 7.51 (d, 1H, J = 7.6, Glu-NH), 7.36-7.29 (m, 10H, 2Ph), 5.14 (s, 2H, CH $_2$ -Ph), 5.07 (s, 2H, CH $_2$ -Ph), 4.60-4.49 (m, 2H, Pro-H α , Glu-H α), 3.50 (m, 1H, Pro-H δ), y 3.39 (m, 1H, Pro-H δ), 2.41-2.35 (m, 2H, Glu-H γ), 2.34-2.15 (m, 2H, Pro-H β , Glu-H β), 2.05 (s, 3H, CH $_3$), 2.08-1.79 (m, 4H, Pro-H β , 2Pro-H γ , Glu-H β); **^{13}C -RMN** (75 MHz, CDCl $_3$) δ (ppm): 172.5 (Glu-CO γ), 171.4 (Glu-CO α), 171.3 (Pro-CO), 170.8 (CH $_3$ -C=O), 135.8 y 135.3 (Ph-C $_1$), 128.5 (Ph), 128.5 (Ph), 128.4 (Ph), 128.2 (Ph), 128.2 (Ph), 128.1 (Ph), 67.2 y 66.4 (CH $_2$ -Ph), 59.6 (Pro-C α), 51.8 (Glu-C α), 48.2 (Pro-C δ), 30.1 (Glu-C γ), 27.6 (Pro-C β), 27.0 (Glu-C β), 25.0 (Pro-C γ), 22.4 (CH $_3$); **EM-ES** (m/z): 489 (34) [M $^+$ +Na], 467 (100) [M $^+$ +1].

Ac-Pro-Glu-OH (22):

Se obtiene por reacción de hidrogenación de **68** durante 3 h para obtener el análogo **22** como un sólido blanco (85%). **P.f.** 174-176 °C (MeOH/Et $_2$ O); [α] $^{20}_D$ = -58.4 (c 0.9, MeOH); **1H -RMN** (500 MHz, H $_2$ O/D $_2$ O) δ (ppm): 8.22 (d, 1H, J = 7.6, Glu-NH), 4.31-4.25 (m, 2H, Pro-H α , Glu-H α), 3.55-3.46 (m, 2H, Pro-H δ), 2.38 (t, 2H, J = 7.2, Glu-H γ), 2.21-2.04 (m, 2H, Pro-H β , Glu-H β), 1.99 (s, 3H, CH $_3$), 1.92-1.82 (m, 4H, Pro-H β , 2Pro-H γ , Glu-H β); **^{13}C -RMN** (125 MHz, H $_2$ O/D $_2$ O) δ (ppm): 177.3 (Glu-CO γ), 174.7 (Glu-CO α), 174.7 (CH $_3$ -C=O), 173.1 (Pro-CO), 60.1 (Pro-C α), 52.2 (Glu-C α), 48.8 (Pro-C δ), 30.1 (Pro-C β), 29.9 (Glu-C γ), 26.0 (Glu-C β), 24.4 (Pro-C γ), 21.5 (CH $_3$); **EM-ES** (m/z): 287 (100) [M $^+$ +1].

5.2.5.2. Síntesis de Gly-Pro-AA₃ en disolución

Síntesis de Boc-Hgl-OH (69) y Boc-D-Hgl-OH (70):

Se disuelven 0.40 mmol de H-Hgl-OH o H-D-Hgl-OH en 5 mL de una mezcla dioxano/H₂O 1:1 y se añade sucesivamente 0.44 mmol de dicarbonato de di-*terc*-butilo, 0.04 mmol de DMAP y 12.40 mmol de Et₃N, dejando la mezcla reacciona a t.a. durante 17 horas. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente a sequedad, se disuelve la mezcla resultante en una disolución de NaCl (10%) y se lleva a pH 1 mediante adición de HCl 0.1N. A continuación, se extrae la fase acuosa con AcOEt (3 x 5 mL) y se juntan los extractos orgánicos, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida obteniendo los correspondientes aminoácidos *N*-Boc protegidos **69** y **70** como sólidos blancos. Sus datos analíticos y espectroscópicos se recogen a continuación:

Boc-Hgl-OH (69): Se obtiene con un 87% de rendimiento. *P.f.* 124-127 °C, *P.f.* lit.¹⁰⁵ 126-127 °C; $[\alpha]^{20}_D = -7.3$ (c 1, MeOH), $[\alpha]^{17}_D$ lit.¹⁰⁵ = -7.8 (c 1, MeOH); *¹H-RMN* (300 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 4.69 (d, 1H, *J* = 7.8, NH), 3.86 (m, 1H, Hgl-H _{α}), 2.20 (t, 2H, *J* = 6.8, Hgl-H _{δ}), 1.63 (m, 1H, Hgl-H _{β}), 1.60-1.40 (m, 3H, Hgl-H _{β} , 2Hgl-H _{γ}), 1.20 (s, 9H, ^tBu); *¹³C-RMN* (75 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 178.5 (Hgl-CO _{δ}), 177.0 (Hgl-CO _{α}), 157.9 (Boc-CO), 81.6 (C-(CH₃)₃), 53.9 (Hgl-C _{α}), 33.3 (Hgl-C _{δ}), 30.1 (Hgl-C _{β}), 27.8 (C-(CH₃)₃), 20.8 (Hgl-C _{γ}); *EM-ES* (m/z): 262 (100) [M⁺+1].

Boc-D-Hgl-OH (70): Se obtiene con un 95% de rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = +6.9$ (c 1, MeOH), $[\alpha]^{20}_D$ lit.¹⁰⁵ = +7.6 (c 1, MeOH). El resto de datos analíticos y espectroscópicos son los mismos que los de su enantiómero **69**.

Síntesis de Boc-Hgl(OBn)-OBn (71) y Boc-D-Hgl(OBn)-OBn (72):

Se obtienen mediante reacción de acoplamiento entre **69** y/o **70** (0.30 mmol) y alcohol bencílico (0.64 mmol) dejándolo reaccionar durante 48 horas. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en AcOEt/Hexano (2:5) para dar el correspondiente

aminoácido dibencilado como un aceite incoloro. Los datos analíticos y espectroscópicos de estos compuestos se recogen a continuación:

Boc-Hgl(OBn)-OBn (71): Se obtiene con un 75% de rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = -1.6$ (c 1, CHCl₃); $^1H\text{-RMN}$ (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.37-7.31 (m, 10H, 2Ph), 5.19 y 5.13 (sist. AB, 2H, $J = -12.3$, CH₂-Ph), 5.10 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.05 (d, 1H, $J = 7.8$, NH), 4.34 (m, 1H, Hgl-H _{α}), 2.40-2.32 (m, 2H, Hgl-H _{δ}), 1.85 (m, 1H, Hgl-H _{β}), 1.75-1.61 (m, 3H, Hgl-H _{β} , 2Hgl-H _{γ}), 1.43 (s, 9H, ^tBu); $^{13}C\text{-RMN}$ (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.7 (Hgl-CO _{δ}), 172.3 (Hgl-CO _{α}), 155.3 (Boc-CO), 135.8 y 135.2 (Ph-C₁), 128.5 (Ph), 128.5 (Ph), 128.3 (Ph), 128.1 (Ph), 128.1 (Ph), 79.8 (C-(CH₃)₃), 67.0 (CH₂-Ph), 66.1 (CH₂-Ph), 53.1 (Hgl-C _{α}), 33.4 (Hgl-C _{δ}), 31.8 (Hgl-C _{β}), 28.2 (C-(CH₃)₃), 20.6 (Hgl-C _{γ}); **EM-ES** (m/z): 464 (89) [M⁺+Na], 342 (100) [M⁺-Boc].

Boc-D-Hgl(OBn)-OBn (72): Se obtiene con un 79% de rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = +1.7$ (c 1, CHCl₃). El resto de datos analíticos y espectroscópicos son los mismos que su enantiómero **71**.

Síntesis de H-Hgl(OBn)-OBn·HCl (73) y H-D-Hgl(OBn)-OBn·HCl (74):

Se obtienen por tratamiento de **71** y/o **72** con una disolución HCl burbujeado en AcOEt 3.2M siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente, como sólidos amorfos blancos tras liofilizar. Los datos analíticos y espectroscópicos se recogen a continuación.

H-Hgl(OBn)-OBn·HCl (73): Se obtiene con un 94% de rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = -2.6$ (c 0.5, CHCl₃), $[\alpha]^{20}_D$ lit.¹⁰⁶ = +10.0 (c 0.5, HCOOH); $^1H\text{-RMN}$ (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.38-7.20 (m, 10H, 2Ph), 5.15 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.02 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.20 (m, 1H, Hgl-H _{α}), 2.39-2.32 (m, 2H, Hgl-H _{δ}), 2.22-1.66 (m, 4H, 2Hgl-H _{β} , 2Hgl-H _{γ}); $^{13}C\text{-RMN}$ (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.6 (Hgl-CO _{δ}), 169.2 (Hgl-CO _{α}), 135.8 y 134.5 (Ph-C₁), 128.4 (Ph), 128.4 (Ph), 128.3 (Ph), 128.0 (Ph), 68.0 y 66.1 (CH₂-Ph), 53.0 (Hgl-C _{α}), 33.1

(Hgl-C_δ), 29.5 (Hgl-C_β), 20.3 (Hgl-C_γ); **EM-ES** (m/z): 464 (7) [M⁺+Na], 342 (100) [M⁺+1].

H-D-Hgl(OBn)-OBn-HCl (74): Se obtiene con un 96% de rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = +2.4$ (c 1, CHCl₃). El resto de datos analíticos y espectroscópicos son idénticos a los de su enantiómero **73**.

Boc-Glu(OBn)-NHMe (75):

Se obtiene mediante acoplamiento entre Boc-Glu(OBn)-OH y clorhidrato de metilamina siguiendo las condiciones generales de reacción descritas previamente. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en AcOEt/Hexano (4:1) para dar **75** como un sólido blanco (99%). **P.f.** 119-122 °C (Et₂O/Hexano), **P.f.** lit.¹⁰⁷ 124-125 °C; $[\alpha]^{20}_D = -4.9$ (c 0.8, CHCl₃), $[\alpha]^{20}_D$ lit.¹⁰⁷ = -6.0 (c 0.1, CHCl₃); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.39-7.32 (m, 5H, Ph), 6.12 (d, 1H, *J* = 6.6, NH-Me), 5.22 (m, 1H, Glu-NH), 5.13 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.12 (m, 1H, Glu-H_α), 2.80 (d, 3H, *J* = 6.6, CH₃), 2.55 (dt, 1H, *J* = -16.8 y 7.3, Glu-H_γ), 2.42 (dt, 1H, *J* = -16.8 y 6.5, Glu-H_γ), 2.13 (m, 1H, Glu-H_β), 1.93 (m, 1H, Glu-H_β), 1.43 (s, 9H, ^tBu); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.1 (Glu-CO_γ), 172.0 (Glu-CO_α), 155.7 (Boc-CO), 135.7 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.3 (Ph), 128.2 (Ph), 80.1 (C₂-(CH₃)₃), 66.6 (CH₂-Ph), 53.7 (Glu-C_α), 30.5 (Glu-C_γ), 28.3 (C₂-(CH₃)₃), 28.1 (Glu-C_β), 25.2 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 350 (100) [M⁺+1].

H-Glu(OBn)-NHMe-HCl (76):

Se obtiene por tratamiento de **75** con una disolución HCl burbujeado en AcOEt 3.2M como un sólido blanco tras liofilizar (98%). **P.f.** 105-108 °C (MeOH/Et₂O); $[\alpha]^{20}_D = +25.0$ (c 1.5, MeOH); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.29 (m, 1H, NH-Me), 7.36-7.22 (m, 5H, Ph), 5.04 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.40 (m, 1H, Glu-H_α), 2.69 (d, 3H, *J* = 3.9, CH₃), 2.60 (t, 2H, *J* = 6.8, Glu-H_γ), 2.34 (m, 1H, Glu-H_β), 2.24 (m, 1H, Glu-H_β); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.9 (Glu-CO_γ), 169.2 (Glu-CO_α), 135.5 (Ph-C₁), 128.5 (Ph), 128.3 (Ph), 66.8 (CH₂-Ph), 52.9 (Glu-C_α), 29.8 (Glu-C_γ), 26.3 (Glu-C_β), 26.3 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 251 (100) [M⁺+1].

Síntesis de los tri péptidos protegidos 77-82:

Se obtienen mediante el procedimiento general de acoplamiento en disolución descrito anteriormente, haciendo reaccionar el correspondiente aminoácido *N*-desprotegido [H-Asp(OBn)-OBn, H-D-Asp(OBn)-OBn, H-Glu(OBn)-NHMe (**76**), H-D-Glu(OBn)-OBn, H-Hgl(OBn)-OBn (**73**) o H-D-Hgl(OBn)-OBn (**74**)] con Z-Gly-Pro-OH. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en las Tablas 5.3 y 5.4.

Boc-Pro-Glu(OBn)-NHMe (83):

Se obtiene mediante reacción de acoplamiento entre Boc-Pro-OH y el derivado de glutámico *N*-desprotegido **76**. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en DCM/MeOH (20:1) para dar **83** como un aceite incoloro (85%). $[\alpha]^{20}_D = -53.4$ (c 1.1, CHCl₃); $^1H\text{-RMN}$ (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.47-7.29 (m, 11H, Glu-NH, 2Ph), 7.11 (m, 1H, NH-Me), 5.13 y 5.07 (sist. AB, 2H, $J = -12.3$, CH₂-Ph), 4.45 (m, 1H, Glu-H _{α}), 4.20 (dd, 1H, $J = 8.2$ y 4.3 , Pro-H _{α}), 3.51 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 3.41 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 2.75 (d, 3H, $J = 4.9$, CH₃), 2.52-2.45 (m, 2H, Glu-H _{γ}), 2.24-1.95 (m, 4H, 2Pro-H _{β} , 2Glu-H _{β}), 1.83 (m, 2H, Pro-H _{γ}), 1.44 (s, 9H, ^tBu); $^{13}C\text{-RMN}$ (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.2 (Glu-CO _{γ}), 172.4 (Pro-CO), 171.2 (Glu-CO _{α}), 170.2 (Boc-CO), 135.5 (Ph-C₁), 128.5 (Ph), 128.3 (Ph), 128.0 (Ph), 80.7 (C-(CH₃)₃), 66.5 (CH₂-Ph), 61.0 (Pro-C _{α}), 52.8 (Glu-C _{α}), 47.1 (Pro-C _{δ}), 30.6 (Glu-C _{γ}), 29.5 (Pro-C _{β}), 28.3 (Glu-C _{β}), 28.3 (C-(CH₃)₃), 26.1 (Pro-C _{γ}), 24.5 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 448 (100) [M⁺+1].

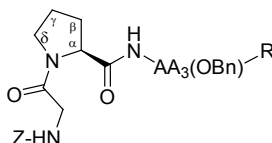
H-Pro-Glu(OBn)-NHMe·CF₃CO₂H (84):

Se disuelve el dipéptido *N*-protegido **83** (150 mg, 0.34 mmol) en 4 mL de CH₂Cl₂ y se añaden 769 μ L de TFA dejando la mezcla reaccionar a t.a. durante 3 horas. Transcurrido este tiempo el disolvente se evapora a sequedad añadiendo CH₂Cl₂ (3 x 2 mL) para eliminar las trazas de TFA y se liofiliza para dar **84** como una espuma (99%). $[\alpha]^{20}_D = -22.5$ (c 1, CHCl₃); $^1H\text{-RMN}$ (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.54 (d, 1H, $J = 7.6$, Glu-NH), 8.38 (m, 1H, NH-Me), 7.36-7.29 (m, 5H, Ph), 5.06 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.79 (m, 1H, Glu-H _{α}), 4.72 (m, 1H, Pro-H _{α}), 3.45 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 3.33 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 2.72 (d,

Ac-Gly-Pro-Glu(OBn)-NHMe (85):

Se obtiene mediante reacción de acoplamiento entre el dipéptido *N*-desprotegido **84** y Ac-Gly-Pro-OH, siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos se recogen en las Tablas 5.3 y 5.4.

Tabla 5.3. Datos analíticos más característicos de los tripéptidos protegidos **77-82** y **85** de fórmula general Gly-Pro-AA₃.



	AA ₃	R	Eluyente	Rdto. (%)	<i>P.f.</i> (°C) ^a	$[\alpha]^{20}_D$	<i>EM-ES</i> (m/z)
77	Asp	OBn	AcOEt/Hexano (10:1)	89	Aceite	-39.6 (c 1.3, CHCl ₃)	602 [M ⁺ +1]
78	D-Asp	OBn	DCM/MeOH (40:1)	78	71-74	-69.5 (c 1, CHCl ₃)	602 [M ⁺ +1]
79	D-Glu	OBn	AcOEt/Hexano (10:1)	83	84-86	-57.4 (c 1, CHCl ₃) ^b	616 [M ⁺ +1]
80	Hgl	OBn	AcOEt/Hexano (7:1)	87	Aceite	-62.7 (c 1, CHCl ₃)	630 [M ⁺ +1]
81	D-Hgl	OBn	AcOEt/Hexano (7:1)	94	Aceite	-61.2 (c 1, CHCl ₃)	630 [M ⁺ +1]
82	Glu	NHMe	DCM/MeOH (10:1)	79	138-140	-59.6 (c 0.5, CHCl ₃) ^c	539 [M ⁺ +1]
85	Glu ^d	NHMe	DCM/MeOH (10:1)	78	232-234	-58.1 (c 1, MeOH)	447 [M ⁺ +1]

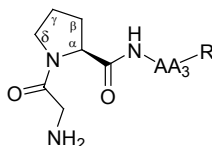
a) Compuestos recristalizados en MeOH/Et₂O. b) $[\alpha]_D^{20}$ lit.^{102a} = -54.8 (c 0.28 CH₂Cl₂). c) Descrito como aceite; $[\alpha]_D^{20}$ lit.^{102a} = -43.8 (c 0.05 MeOH). d) Fórmula general de **85**: Ac-Gly-Pro-Glu(OBn)-NHMe.

TABLA 5.4

Síntesis de los tripéptidos desprotegidos 23-29:

Se obtienen a partir de los correspondientes derivados *N*- y *C*-protegidos **77-82** y **85** mediante el procedimiento general de eliminación de grupos protectores *Z* y *Bn* descrito anteriormente, manteniendo la atmósfera de H₂ durante 6 horas. Pasado este tiempo se elimina la atmósfera de H₂ y en los casos que se observa un precipitado blanco se añade agua hasta disolverlo. Se filtra entonces el catalizador por filtro Whatman de pliegues, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se disuelve en H₂O y se liofiliza obteniendo cuantitativamente los correspondientes derivados tripeptídicos desprotegidos **23-29** como sólidos blancos. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en las Tablas 5.5 y 5.6.

Tabla 5.5. Datos analíticos más característicos de los tripéptidos desprotegidos **23-29** de fórmula general Gly-Pro-AA₃.



	AA ₃	R	Rdto. (%)	P.f. (°C) ^a	$[\alpha]^{20}_D$	EM-ES (m/z)
23	Asp	OH	97	Sólido amorfo	-75.2 (c 0.5, H ₂ O)	288 [M ⁺ +1]
24	D-Asp	OH	94	212-214	-67.9 (c 0.5, H ₂ O)	288 [M ⁺ +1]
25	D-Glu	OH	98	199-202 ^b	-64.5 (c 0.3, H ₂ O) ^b	302 [M ⁺ +1]
26	Hgl	OH	95	138-141	-74.6 (c 0.5, H ₂ O)	316 [M ⁺ +1]
27	D-Hgl	OH	98	146-149	-52.9 (c 0.5, H ₂ O)	316 [M ⁺ +1]
28	Glu	NHMe	99	42-45 ^c	-81.6 (c 1, MeOH) ^c	302 [M ⁺ +1]
29	Glu ^d	NHMe	99	138-141	-74.3 (c 0.9, MeOH)	315 [M ⁺ +1]

a) Compuestos recristalizados en MeOH/Et₂O. b) P.f. lit.^{102a} = 198-200 °C; $[\alpha]^{20}_D$ lit.^{102a} = -70.6 (c 0.27, H₂O). c) P.f. lit.^{102a} = 42-44 °C; $[\alpha]^{20}_D$ lit.^{102a} = -58.2 (c 0.08 MeOH). d) Fórmula general de **29**: Ac-Gly-Pro-Glu-NHMe.

TABLA 5.6

5.2.5.3. Síntesis de Gly-AA₂-Glu

a) Síntesis en fase sólida

Mediante los procedimientos generales descritos anteriormente de síntesis en fase sólida, se han sintetizado los análogos pertenecientes a la serie de cambios de prolina **30-37**, tal como se describe en el Esquema 3.8 del Apartado 3.2.3. Los aminoácidos *N*-protegidos que se utilizaron fueron: Fmoc-Acp-OH, Fmoc-Ach-OH, Fmoc-Pip-OH, Fmoc-Aze-OH, Fmoc-amp(Boc)-OH, Fmoc-Hyp(O^tBu)-OH, Fmoc-Oic-OH y Alloc-Ahc-OH. Los análogos desprotegidos **30-37** fueron purificados por cromatografía en fase reversa utilizando como eluyente un gradiente de Acetonitrilo en Agua (0-10%). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos compuestos y de sus correspondientes intermedios protegidos **102-109** se recogen en las Tablas 5.7, 5.8 y 5.9.

Tabla 5.7. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los tripéptidos protegidos **102-109** de fórmula general Gly-AA₂-Glu.

	102	103	104	105
AA ₂				
Rdto.(%)	76	79	97	90
P. f. (°C) ^a	202-205	188-191	Sirupe	Sirupe
[α] ²⁰ _D	+13.6 (c 0.7, H ₂ O)	+8.8 (c 1.1, MeOH)	N.D.	N.D.
EM-ES (m/z)	344 [M ⁺ +1]	386 [M ⁺ +1]	372 [M ⁺ +1]	344 [M ⁺ +1]
¹H-RMN^{b, c}				
Gly				
H _α	3.41 y 3.36 (AB, -15.6)	3.59 y 3.47 (AB, -15.6)	3.83 y 3.74 (AB, -17.5)	3.45 y 3.26 (AB, -16.2)
AA₂				
NH	8.89 (s)	8.35 (s)		
H ₂	1.29 y 0.87 (m)	2.20-1.98 (m)	5.00 (m)	4.90 (dd, 9.0, 5.4)
H ₃	1.18 y 0.79 (m)	1.80 y 1.29 (m)	1.96-1.55 (m)	2.45 y 2.12 (m)
H ₄		1.34 y 1.18 (m)	1.58-1.09 (m)	3.90-3.82 (m)
H ₅			1.58-1.09 (m)	
H ₆			3.15 (t, 6.0)	
Glu				
NH	7.83 (d, 7.8)	7.40 (d, 6.6)	7.68 (d, 6.9)	8.05 (d, 7.5)
H _α	3.98 (m)	3.79 (m)	4.01 (m)	4.09 (m)
H _β	1.90 y 1.65 (m)	1.89 y 1.70 (m)	2.12 y 1.89 (m)	1.93 y 1.76 (m)
H _γ	2.13 (t, 7.8)	2.13-2.05 (m)	2.46-2.22 (m)	2.19 (t, 6.8)
¹³C-RMN^b				
Gly				
C _α	41.0	40.6	41.1	38.7
AA₂				
C ₁	34.7	57.8		
C ₂	16.2	32.4	53.4	62.0
C ₃	16.2	24.6	24.4	21.2
C ₄		20.8	26.8	46.2
C ₅			19.7	
C ₆			43.1	
Glu				
C _α	52.3	52.1	51.9	52.1
C _β	26.3	25.9	26.5	27.2
C _γ	30.9	31.0	31.8	31.6

a) Compuestos recristalizados en MeOH/Et₂O. b) Espectros realizados en muestras disueltas en DMSO-d₆ a 300 MHz para ¹H-RMN y 75 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. c) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz).

Tabla 5.7. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los tripéptidos protegidos **102-109** de fórmula general Gly-AA₂-Glu (Continuación).

	106	107	108	109
AA ₂				
Rdto.(%)	91	82	99	87
P. f. (°C) ^a	149-152	Sólido céreo	85-88	Espuma
[α] ²⁰ _D	-25.0 (c 0.2, MeOH)	-40.3 (c 0.1, MeOH)	-26.0 (c 0.7, MeOH)	-2.8 (c 0.3, MeOH)
EM-ES (m/z)	473 [M ⁺ +1]	430 [M ⁺ +1]	512 [M ⁺ +1]	384 [M ⁺ +1]
¹ H-RMN ^{b, c}				
Gly				
H _α	3.96 y 3.49 (AB, -16.5)	4.02 y 3.49 (AB, -16.6)	4.12 y 3.86 (ABX, -16.8, 5.5, 3.8) ^d	3.84 (s)
AA₂				
H ₂	4.03 (dd, 9.1, 4.5)	4.26 (m)	4.47 (m)	
H ₃	2.24 y 1.68 (m)	2.03-1.98 (m)	2.32 y 2.06 (m)	1.86 y 1.76 (m)
H ₄	4.06 (m)	4.27 (m)	2.37 (m)	1.67 y 1.52 (m)
H ₅	3.55 (m) y 3.11 (dd, -11.4, 7.8)	3.64 (dd, -9.6, 4.4) y 3.10 (d, -9.6)	3.76 (m)	4.49 (t, 4.7)
Glu				
NH	8.01 (d, 4.2)	8.08 (m)	7.50 (d, 7.1)	7.82 (d, 8.0)
H _α	4.20 (m)	3.29 (t, 5.0)	4.51 (m)	4.20 (m)
H _β	2.22 y 1.83 (m)	1.91-1.82 (m)	2.18 y 2.01 (m)	1.95 y 1.78 (m)
H _γ	2.46-2.38 (m)	2.38-2.24 (t, 7.3)	2.45-2.38 (m)	2.22-2.34 (m)
¹³ C-RMN ^b				
Gly				
C _α	46.3	46.3	42.7	46.0
AA₂				
C ₂	57.6	57.9	60.2	69.6
C ₃	33.9	36.3	29.2	34.2
C ₄	48.0	70.8	37.2	29.4
C ₅	49.9	55.6	58.2	54.3
Glu				
C _α	53.8	54.0	52.2	53.2
C _β	27.0	27.1	27.0	26.4
C _γ	31.9	31.8	31.6	31.2

a) Compuestos recristalizados en MeOH/Et₂O. b) Espectros realizados en muestras disueltas en DMSO-d₆ a 300 MHz para ¹H-RMN y 75 MHz para ¹³C-RMN, excepto **108** cuyos espectros se registraron en H₂O/D₂O, a 500 MHz para ¹H-RMN y 125 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. c) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). d) El residuo de Gly se encuentra N-prottegido con un grupo Boc.

Tabla 5.8. Datos analíticos más relevantes de los tripéptidos desprotegidos **30-37** de fórmula general Gly-AA₂-Glu.

	AA ₂	Rdto. (%)	P.f. (°C) ^a	$[\alpha]_D^{20}$	EM-ES (m/z)	cis/trans
30		94	Espuma	-6.9 (c 1, MeOH)	288 [M ⁺ +1]	---
31		96	110-113	-2.4 (c 1, MeOH)	330 [M ⁺ +1]	---
32		97	99-102	-45.6 (c 1.1, MeOH)	316 [M ⁺ +1]	21:79
33		99	Sólido amorfo	-85.3 (c 0.6, MeOH)	288 [M ⁺ +1]	35:65
34		87	Espuma	-9.2 (c 1.1, MeOH)	317 [M ⁺ +1]	22:78
35		83	163-166	-40.5 (c 0.6, MeOH)	318 [M ⁺ +1]	19:81
36		93	129-131	-39.3 (c 1, MeOH)	356 [M ⁺ +1]	12:88
37		93	119-122	+25.3 (c 0.3, MeOH)	328 [M ⁺ +1]	25:75

a) Compuestos recrystalizados en MeOH/Et₂O.

TABLA 5.9

b) Síntesis en disolución

Mediante los procedimientos generales descritos anteriormente de síntesis en disolución, se han sintetizado los análogos de GPE **38-44** de acuerdo con los Esquemas 3.9-3.13. Todos ellos, así como sus correspondientes intermedios protegidos, se recogen a continuación:

Boc-Gly-dmT-Glu(O^tBu)-O^tBu (112):

A una disolución de Boc-Gly-OH (319 mg, 1.82 mmol) en 8 mL de CH₂Cl₂/DMF (2:1) se le añade, sucesivamente, BOP (806 mg, 1.82 mmol), DIEA (780 µL, 4.60 mmol) y la pseudoprolina H-dmT-OH (**110**) (300 mg, 1.51 mmol) y se deja reaccionar a t.a. durante 18 h. Pasado este tiempo la reacción se lava sucesivamente con una disolución de ácido cítrico (10%) y NaHCO₃ (10%) extrayendo con CH₂Cl₂ (3 x 2 mL) cada una. Los extractos orgánicos se juntan, se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro, y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (CH₂Cl₂/MeOH, 5:1) para dar el correspondiente pseudodipéptido *N*-protegido **111** como un sirupe incoloro (26%). A continuación, se disuelve **111** en CH₂Cl₂ (3 mL) y se acopla, según las condiciones de acoplamiento en disolución descritas con anterioridad, con H-Glu(O^tBu)-O^tBu·HCl, obteniendo, tras su purificación por cromatografía en columna (Hexano/AcOEt, 2:1) el tripéptido **112** como un sólido blanco. Sus datos analíticos y espectroscópicos más característicos se recogen en la Tabla 5.9.

Fmoc-Thz-Glu(O^tBu)-O^tBu (113):

Se obtiene por reacción de acoplamiento entre Fmoc-Thz-OH y H-Glu(O^tBu)-O^tBu·HCl. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en Hexano/AcOEt (2:1) obteniendo **113** como un sólido blanco (95%). *P.f.* 88-90 °C (Et₂O/Hexano); [α]_D²⁰ = -64.9 (c 1, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.76 (d, 2H, *J* = 7.2, Fmoc-H₄), 7.55 (m, 2H, Fmoc-H₁), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.2, Fmoc-H₃), 7.31 (t, 2H, *J* = 7.2, Fmoc-H₂), 6.97 (m, 1H, Glu-NH), 4.80-4.57 (m, 2H, Thz-H_α, Thz-H_β), 4.43-4.36 (m, 4H, Thz-

H_δ, Glu-H_α, 2Fmoc-H₁₀), 4.25 (t, 1H, $J = 6.9$, Fmoc-H₉), 3.41 (m, 1H, Thz-H_β), 3.22 (m, 1H, Thz-H_β), 2.38-2.08 (m, 3H, Glu-H_β 2Glu-H_γ), 1.92 (m, 1H, Glu-H_β), 1.43 (s, 18H, ^tBu); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.3 (Glu-CO_γ), 170.5 (Glu-CO_α), 169.6 (Thz-CO_α), 154.9 (Fmoc-CO), 143.5 (Fmoc-C_{1a}), 141.3 (Fmoc-C_{4a}), 127.8 (Fmoc-C₃), 127.2 (Fmoc-C₂), 125.0 (Fmoc-C₁), 120.0 (Fmoc-C₄), 82.4 y 80.7 (C-(CH₃)₃), 68.4 (Fmoc-C₁₀), 63.3 (Thz-C_α), 52.4 (Glu-C_α), 49.9 (Thz-C_δ), 47.0 (Fmoc-C₉), 33.0 (Thz-C_β), 31.3 (Glu-C_γ), 28.0 (C-(CH₃)₃), 27.6 (Glu-C_β); **EM-ES** (m/z): 597 (100) [M⁺+1].

H-Thz-Glu(O^tBu)-O^tBu (114):

Se disuelve el dipéptido Fmoc-protégido **113** (150 mg, 0.25 mmol) en 5 mL de una mezcla de piperidina/DMF (1:4) y se deja reaccionar a t.a. durante una hora. Una vez completada la reacción se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purifica por cromatografía radial en Hexano/AcOEt (2:1) obteniéndose **114** como un aceite (83%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.56 (d, 1H, $J = 8.1$, Glu-NH), 4.42 (m, 1H, Glu-H_α), 4.24 (d, 1H, $J = -9.9$, Thz-H_δ), 4.12 (dd, 1H, $J = 7.6$ y 4.5, Thz-H_α), 3.98 (d, 1H, $J = -9.9$, Thz-H_δ), 3.36 (dd, 1H, $J = -10.9$ y 4.5, Thz-H_β), 3.11 (dd, 1H, $J = -10.9$ y 7.6, Thz-H_β), 2.34-2.06 (m, 3H, Glu-H_β, 2Glu-H_γ), 1.87 (m, 1H, Glu-H_β), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.42 (s, 9H, ^tBu); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.0 (Glu-CO_γ), 170.9 (Glu-CO_α), 170.7 (Thz-CO_α), 82.4 y 80.7 (C-(CH₃)₃), 65.9 (Thz-C_α), 53.7 (Thz-C_δ), 52.0 (Glu-C_α), 35.5 (Thz-C_β), 31.4 (Glu-C_γ), 28.0 y 27.9 (C-(CH₃)₃), 27.7 (Glu-C_β); **EM-ES** (m/z): 375 (100) [M⁺+1].

Boc-P^{Me}-Glu(OBn)-OBn (116):

Se obtiene por reacción de acoplamiento entre Boc-P^{Me}-OH y H-Glu(OBn)-OBn·HCl. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en AcOEt/Hexano (1:2) para dar **116** como un aceite (92%). $[\alpha]^{20}_D = -42.9$ (c 1, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36-7.31 (m, 10H, 2Ph), 6.81 (m, 1H, Glu-NH), 5.15 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.59 (m, 1H, Glu-H_α), 3.66-3.31 (m, 2H, P^{Me}-H_δ), 2.58-2.31 (m, 3H, P^{Me}-H_β, Glu-2H_γ), 2.23 (m, 1H, Glu-H_β), 2.02 (m, 1H, Glu-H_β), 1.76 (m, 1H, P^{Me}-H_γ), 1.64-1.48 (m, 2H, P^{Me}-H_β, P^{Me}-H_γ), 1.47-1.30 (m, 12H, P^{Me}-CH₃, ^tBu); ¹³C-RMN

(75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.2 (P^{Me}-CO), 172.0 (Glu-CO _{γ}), 171.5 (Glu-CO _{α}), 158.8 (Boc-CO), 135.7 y 135.2 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.2 (Ph), 80.6 (C-(CH₃)₃), 67.2 y 66.5 (CH₂-Ph), 53.4 (P^{Me}-C _{α}), 51.8 (Glu-C _{α}), 48.0 (P^{Me}-C _{δ}), 38.8 (P^{Me}-C _{β}), 30.1 (Glu-C _{γ}), 28.4 (C-(CH₃)₃), 27.4 (Glu-C _{β}), 22.6 (P^{Me}-C _{γ}), 22.4 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 539 (100) [M⁺+1].

H-P^{Me}-Glu(OBn)-OBn·HCl (117):

Se obtiene por tratamiento de **116** con una disolución HCl burbujeado en AcOEt 3.2M como una espuma tras liofilizar (98%). $[\alpha]^{20}_D = -46.4$ (c 1, CHCl₃); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.27 (m, 1H, Glu-NH), 7.38-7.28 (m, 10H, 2Ph), 5.21-5.05 (m, 4H, CH₂-Ph), 4.51 (m, 1H, Glu-H _{α}), 3.52 (m, 1H, P^{Me}-H _{δ}), 3.24 (m, 1H, P^{Me}-H _{δ}), 2.57-2.42 (m, 3H, P^{Me}-H _{β} , Glu-2H _{γ}), 2.24-2.16 (m, 2H, Glu-H _{β}), 2.10-1.93 (m, 2H, P^{Me}-H _{β} , P^{Me}-H _{γ}), 1.90-1.72 (m, 4H, P^{Me}-H _{γ} , CH₃); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.7 (Glu-CO _{γ}), 171.2 (Glu-CO _{α}), 170.6 (P^{Me}-CO), 135.3 y 135.1 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.2 (Ph), 69.9 (P^{Me}-C _{α}), 67.4 y 67.0 (CH₂-Ph), 53.2 (Glu-C _{α}), 45.5 (P^{Me}-C _{δ}), 36.1 (P^{Me}-C _{β}), 30.7 (Glu-C _{γ}), 25.3 (Glu-C _{β}), 23.0 (P^{Me}-C _{γ}), 21.6 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 475 (100) [M⁺+1].

Boc-L,D-dmP-OH (120):

A una disolución de H-L,D-dmP-OH (**L,D-119**) (72 mg, 0.50 mmol) en una mezcla 1,4-dioxano/H₂O (1:1, 5 mL) se añaden, sucesivamente, dicarbonato de di-*terc*-butilo (120 mg, 0.55 mmol), DMAP (6 mg, 0.05 mmol) y Et₃N (139 μ L, 1.00 mmol) y se mantiene la agitación a t.a. durante 4 horas. Pasado este tiempo se elimina el disolvente y el residuo resultante se disuelve en CH₂Cl₂ (10 mL), se lava con HCl 0.1N, se extrae con más CH₂Cl₂, se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora a sequedad obteniendo el compuesto **120** como un aceite incoloro sin necesidad de posterior purificación (111 mg, 91%). **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.41 (d, 1H, *J* = 6.8, dmP-H _{α}), 2.18 (m, 1H, dmP-H _{β}), 2.03 (m, 1H, dmP-H _{β}), 1.95 (m, 1H, dmP-H _{γ}), 1.78 (m, 1H, dmP-H _{γ}), 1.49 (s, 9H, ^tBu), 1.43 (s, 3H, Me), 1.31 (s, 3H, Me); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 178.9 (dmP-CO), 156.4 (Boc-CO), 81.5 (C-(CH₃)₃), 61.6 (dmP-C _{α}), 61.2 (dmP-C _{δ}), 40.9 (dmP-C _{γ}), 28.4

(C-(CH₃)₃), 27.6 (CH₃), 25.9 (CH₃), 24.9 (dmP-C_β); **EM-ES** (m/z): 265 (76) [M⁺+Na], 243 (100) [M⁺+1].

Síntesis de la mezcla diastereomérica Boc-dmP-Glu(OBn)-OBn (121) y Boc-D-dmP-Glu(OBn)-OBn (122):

Se obtiene por reacción de acoplamiento entre Boc-L,D-dmP-OH (**120**) y H-Glu(OBn)-OBn·HCl. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en CH₂Cl₂/MeOH (40:1) para dar la mezcla de epímeros **121** y **122** (67%). Los dos diastereoisómeros son separables por cromatografía en columna utilizando como eluyente éter/Hexano (3:1). Los datos analíticos y espectroscópicos de estos derivados se recogen a continuación:

Boc-dmP-Glu(OBn)-OBn (121): Se obtiene como un sólido blanco (36%). **P.f.** 77-79 °C (AcOEt/Hexano); [α]²⁰_D = -35.8 (c 0.5, CHCl₃); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.44-7.28 (m, 11H, 2Ph, Glu-NH), 5.14 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.07 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.62 (m, 1H, Glu-H_α), 4.31 (m, 1H, dmP-H_α), 2.41-2.33 (m, 2H, Glu-H_γ), 2.25 (m, 1H, Glu-H_β), 2.17-1.90 (m, 3H, 2dmP-H_β, Glu-H_β), 1.77-1.68 (m, 2H, dmP-H_γ), 1.43 (s, 9H, ^tBu), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.31 (s, 3H, CH₃); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.3 (dmP-CO), 172.3 (Glu-CO_γ), 171.4 (Glu-CO_α), 155.9 (Boc-CO), 135.7 y 135.1 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.2 (Ph), 80.5 (C-(CH₃)₃), 67.2 y 66.4 (CH₂-Ph), 62.9 (dmP-C_δ), 62.1 (dmP-C_α), 51.4 (Glu-C_α), 41.3 (dmP-C_γ), 29.9 (Glu-C_γ), 28.3 (C-(CH₃)₃), 27.6 (Glu-C_β), 25.8 (CH₃), 24.8 (dmP-C_β), 24.7 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 575 (60) [M⁺+Na], 553 (100) [M⁺+1].

Boc-D-dmP-Glu(OBn)-OBn (122): Se obtiene como un aceite incoloro (31%). [α]²⁰_D = +38.1 (c 1, CHCl₃); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.41-7.24 (m, 11H, 2Ph, Glu-NH), 5.14 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.68 (m, 1H, Glu-H_α), 4.32 (m, 1H, dmP-H_α), 2.43-2.36 (m, 2H, Glu-H_γ), 2.28 (m, 1H, Glu-H_β), 2.19-1.80 (m, 3H, 2dmP-H_β, Glu-H_β), 1.72-1.64 (m, 2H, dmP-H_γ), 1.46-1.39 (m, 12H, CH₃, ^tBu), 1.32 (s, 3H, CH₃); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.3 (Glu-CO_γ), 171.4 (Glu-CO_α),

168.4 (dmP-CO), 156.6 (Boc-CO), 135.7 y 135.1 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.2 (Ph), 80.3 (C-(CH₃)₃), 67.3 y 66.4 (CH₂-Ph), 63.4 (dmP-C_δ), 62.2 (dmP-C_α), 51.4 (Glu-C_α), 41.1 (dmP-C_γ), 30.1 (Glu-C_γ), 29.8 (Glu-C_β), 28.3 (C-(CH₃)₃), 27.5 (dmP-C_β), 25.5 (CH₃), 24.2 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 575 (100) [M⁺+Na], 553 (78) [M⁺+1].

H-dmP-Glu(OBn)-OBn-HCl (123):

Se obtiene por tratamiento de **121** con una disolución de HCl burbujeado en AcOEt 3.2M como un sirupe tras liofilizar (98%). $[\alpha]^{20}_D = -33.2$ (c 0.8, CHCl₃); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.61 (d, 1H, *J* = 6.4, Glu-NH), 7.36-7.27 (m, 10H, 2Ph), 5.21-5.05 (m, 4H, CH₂-Ph), 4.84 (m, 1H, dmP-H_α), 4.50 (m, 1H, Glu-H_α), 2.48 (m, 1H, dmP-H_β), 2.41 (t, 2H, *J* = 7.4, Glu-H_γ), 2.17-1.96 (m, 3H, dmP-H_β, 2Glu-H_β), 1.79 y 1.66 (m, 2H, dmP-H_γ), 1.44 (s, 3H, CH₃), 1.42 (s, 3H, CH₃); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.9 (Glu-CO_γ), 170.5 (Glu-CO_α), 169.4 (dmP-CO), 135.6 y 135.1 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.2 (Ph), 67.4 (dmP-C_δ), 66.8 y 66.4 (CH₂-Ph), 58.9 (dmP-C_α), 52.7 (Glu-C_α), 38.0 (dmP-C_γ), 30.3 (Glu-C_γ), 29.1 (dmP-C_β), 26.1 (CH₃), 25.8 (Glu-C_β), 24.7 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 453 (100) [M⁺+1].

H-D-dmP-Glu(OBn)-OBn-HCl (124):

Se obtiene por tratamiento de **122** con una disolución de HCl burbujeado en AcOEt 3.2M como un sirupe tras liofilizar (98%). $[\alpha]^{20}_D = +5.2$ (c 1, CHCl₃); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.81 (m, 1H, Glu-NH), 7.38-7.24 (m, 10H, 2Ph), 5.16-5.03 (m, 4H, CH₂-Ph), 4.85 (m, 1H, dmP-H_α), 4.61 (m, 1H, Glu-H_α), 2.58 (m, 1H, dmP-H_β), 2.39 (t, 2H, *J* = 6.4, Glu-H_γ), 2.31-1.96 (m, 3H, dmP-H_β, 2Glu-H_β), 1.88 y 1.77 (m, 2H, dmP-H_γ), 1.48 (s, 3H, CH₃), 1.47 (s, 3H, CH₃); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.2 (Glu-CO_γ), 171.4 (Glu-CO_α), 169.3 (dmP-CO), 135.6 y 134.9 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.2 (Ph), 67.5 (dmP-C_δ), 66.5 y 66.4 (CH₂-Ph), 59.2 (dmP-C_α), 52.3 (Glu-C_α), 38.1 (dmP-C_γ), 30.0 (Glu-C_γ), 29.7 (dmP-C_β), 26.7 (Glu-C_β), 26.0 (CH₃), 24.8 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 453 (100) [M⁺+1].

Boc-D-Pro-Glu(OBn)-OBn (127):

Se obtiene por reacción de acoplamiento entre Boc-D-Pro-OH y H-Glu(OBn)-OBn·HCl. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en AcOEt/Hexano (1:1) para dar el dipéptido protegido **127** como un aceite incoloro (98%). $[\alpha]^{20}_D = +10.2$ (c 1, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.38-7.29 (m, 10H, 2Ph), 6.74 (m, 1H, Glu-NH), 5.16 y 5.11 (sist. AB, 2H, $J = -12.3$, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.09 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.67 (m, 1H, Glu- H_α), 4.26 (m, 1H, Pro- H_α), 3.55-3.24 (m, 2H, Pro- H_δ), 2.51-2.32 (m, 3H, Pro- H_β , Glu-2 H_γ), 2.26 (m, 1H, Glu- H_β), 2.17-1.93 (m, 2H, Pro- H_β , Glu- H_β), 1.82 (m, 2H, 2Pro- H_γ), 1.42 (s, 9H, ^tBu); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.4 (Pro-CO), 172.4 (Glu-CO $_\gamma$), 171.4 (Glu-CO $_\alpha$), 156.7 (Boc-CO), 135.7 y 135.1 (Ph- C_1), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.5 (Ph), 128.2 (Ph), 80.5 ($\underline{\text{C}}\text{-(CH}_3)_3$), 67.2 y 66.5 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 60.0 (Pro- C_α), 51.4 (Glu- C_α), 47.0 (Pro- C_δ), 30.1 (Glu- C_γ), 30.0 (Pro- C_β), 28.3 ($\text{C-(}\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 27.3 (Glu- C_β), 24.6 (Pro- C_γ); **EM-ES** (m/z): 547 (56) [$\text{M}^+ + \text{Na}$], 525 (100) [$\text{M}^+ + 1$].

Boc-D-Pro-D-Glu(OBn)-OBn (128):

Se obtiene por reacción de acoplamiento entre Boc-D-Pro-OH y H-D-Glu(OBn)-OBn·HCl. El residuo obtenido se purifica por cromatografía radial en AcOEt/Hexano (1:1) obteniendo el dipéptido protegido **128** como un aceite incoloro (99%). $[\alpha]^{20}_D = +33.7$ (c 1, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.40-7.24 (m, 10H, 2Ph), 6.78 (m, 1H, Glu-NH), 5.15 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.08 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.62 (m, 1H, Glu- H_α), 4.24 (m, 1H, Pro- H_α), 3.49-3.25 (m, 2H, Pro- H_δ), 2.46-2.10 (m, 3H, Pro- H_β , 2Glu- H_γ), 2.22 (m, 1H, Glu- H_β), 1.99 (m, 1H, Glu- H_β), 1.95-1.75 (m, 3H, Pro- H_β , 2Pro- H_γ), 1.42 (s, 9H, ^tBu); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.4 (Pro-CO), 172.4 (Glu-CO $_\gamma$), 171.4 (Glu-CO $_\alpha$), 156.7 (Boc-CO), 135.7 y 135.2 (Ph- C_1), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.4 (Ph), 128.2 (Ph), 80.4 ($\underline{\text{C}}\text{-(CH}_3)_3$), 67.2 y 66.4 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 59.8 (Pro- C_α), 51.5 (Glu- C_α), 47.0 (Pro- C_δ), 30.0 (Glu- C_γ), 30.0 (Pro- C_β), 28.2 ($\text{C-(}\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 27.4 (Glu- C_β), 24.6 (Pro- C_γ); **EM-ES** (m/z): 547 (46) [$\text{M}^+ + \text{Na}$], 525 (100) [$\text{M}^+ + 1$].

H-D-Pro-Glu(OBn)-OBn-HCl (129):

Se obtiene tras desprotección de **127** por tratamiento con una disolución de HCl burbujeado en AcOEt 3.2M como un sólido tras liofilizar (96%). **P.f.** 128-130 °C (MeOH/Et₂O); $[\alpha]_D^{20} = +12.8$ (c 1.1, CHCl₃); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.29 (d, 1H, *J* = 6.1, Glu-NH), 7.41-7.28 (m, 10H, 2Ph), 5.11-5.02 (m, 4H, CH₂-Ph), 4.79 (m, 1H, Pro-H_α), 4.56 (m, 1H, Glu-H_α), 3.43 y 3.23 (m, 2H, Pro-H_δ), 2.58 (m, 1H, Pro-H_β), 2.48-2.38 (m, 2H, Glu-H_γ), 2.26 (m, 1H, Glu-H_β), 2.12 (m, 1H, Glu-H_β), 2.03 (m, 1H, Pro-H_γ), 1.95-1.85 (m, 2H, Pro-H_β, Pro-H_γ); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.2 (Pro-CO), 171.5 (Glu-CO_γ), 169.1 (Glu-CO_α), 135.7 y 135.1 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.4 (Ph), 128.3 (Ph), 128.1 (Ph), 67.4 y 66.5 (CH₂-Ph), 59.7 (Pro-C_α), 52.1 (Glu-C_α), 46.7 (Pro-C_δ), 30.7 (Glu-C_γ), 30.3 (Pro-C_β), 26.4 (Glu-C_β), 24.7 (Pro-C_γ); **EM-ES** (m/z): 425 (100) [M⁺+1].

H-D-Pro-D-Glu(OBn)-OBn-HCl (130):

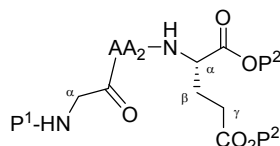
Se obtiene por tratamiento del dipéptido protegido **128** con una disolución de HCl burbujeado en AcOEt 3.2M como un aceite tras liofilizar (94%), $[\alpha]_D^{20} = +37.7$ (c 0.2, MeOH); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.70 (m, 1H, Glu-NH), 7.41-7.20 (m, 10H, 2Ph), 5.14 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.07 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.52 (m, 1H, Glu-H_α), 3.92 (m, 1H, Pro-H_α), 3.53-3.14 (m, 2H, Pro-H_δ), 2.68-2.36 (m, 3H, Pro-H_β, 2Glu-H_γ), 2.32-2.09 (m, 2H, Pro-H_β, Glu-H_β), 2.06-1.87 (m, 2H, Pro-H_γ), 1.80 (m, 1H, Glu-H_β); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.8 (Pro-CO), 170.7 (Glu-CO_γ), 169.0 (Glu-CO_α), 135.6 y 135.2 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.4 (Ph), 128.3 (Ph), 128.2 (Ph), 67.3 y 66.7 (CH₂-Ph), 59.7 (Pro-C_α), 52.7 (Glu-C_α), 46.9 (Pro-C_δ), 30.7 (Glu-C_γ), 30.5 (Pro-C_β), 26.1 (Glu-C_β), 24.4 (Pro-C_γ); **EM-ES** (m/z): 425 (100) [M⁺+1].

Acoplamiento de P-Gly (P = Z, Boc) con los derivados dipeptídicos N-desprotegidos 114, 117, 123, 124, 129 y 130:

En un matraz se disuelven 0.20 mmol del correspondiente dipéptido *N*-desprotegido (**114**, **117**, **123**, **124**, **129** ó **130**) en 5 mL de CH₂Cl₂ y se adicionan, sucesivamente, 0.24 mmol de Z-Gly-OH (Boc-Gly-OH para **114**), 0.24 mmol de BOP

(HATU para **123** y **124**) y DIEA (0.44 mmol), dejando la mezcla resultante reaccionar durante 18 horas. Pasado este tiempo se lava la reacción siguiendo el procedimiento general descrito para reacciones de acoplamiento y el residuo obtenido se purifica por cromatografía radial utilizando el eluyente indicado en cada caso. De este modo, se obtienen los correspondientes tripéptidos protegidos derivados de prolina Gly-Thz-Glu, Gly-P^{Me}-Glu, Gly-dmP-Glu, Gly-D-dmP-Glu, Gly-D-Pro-Glu y Gly-D-Pro-D-Glu (**115**, **118**, **125**, **126**, **131** y **132** respectivamente). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos compuestos se recogen en las Tablas 5.9 y 5.10.

Tabla 5.9. Datos analíticos más característicos de los tripéptidos protegidos de fórmula general Gly-AA₂-Glu, **112**, **115**, **118**, **125**, **126**, **131** y **132**.



	AA ₂	P ¹ , P ²	Eluyente	Rdto. (%)	P.f. (°C) ^a	$[\alpha]^{20}_D$	EM-ES (m/z)
112	dmT	Boc, ^t Bu	AcOEt/Hexano (1:1)	69	127-130	-47.2 (c 1, CHCl ₃)	560 [M ⁺ +1]
115	Thz	Boc, ^t Bu	AcOEt/Hexano (1:2)	54	90-93	-73.0 (c 1, CHCl ₃)	532 [M ⁺ +1]
118	P ^{Me}	Z, OBn	AcOEt/Hexano (3:1)	72	Aceite	-35.9 (c 0.9, CHCl ₃)	630 [M ⁺ +1]
125	dmP	Z, OBn	AcOEt/Hexano (2:1)	89	Sirupe	-37.6 (c 0.8, CHCl ₃)	644 [M ⁺ +1]
126	D-dmP	Z, OBn	AcOEt/Hexano (2:1)	91	Sirupe	+28.0 (c 0.5, CHCl ₃)	644 [M ⁺ +1]
131	D-Pro	Z, OBn	AcOEt/Hexano (3:1)	88	90-92	+58.6 (c 1, CHCl ₃)	616 [M ⁺ +1]
132	D-Pro ^b	Z, OBn	AcOEt/Hexano (3:1)	82	Espuma	-84.1 (c 1, CHCl ₃)	616 [M ⁺ +1]

a) Compuestos recristalizados en Et₂O/Hexano. b) Fórmula general de **132**: Gly-D-Pro-D-Glu.

TABLA 5.10

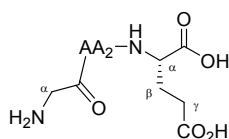
Desprotección conjunta de los grupos Boc y ^tBu de los tripéptidos 112 y 115:

Para la eliminación de los grupos protectores Boc y ^tBu de los tripéptidos derivados de dmT y Thz, **112** y **115**, se trata el correspondiente tripéptido protegido con TFA en CH₂Cl₂, según el procedimiento general descrito anteriormente, y se deja la mezcla reaccionar a t.a. durante 6 h en el caso del derivado **112** y 15 h para **115**. Una vez completada la reacción, el disolvente se evapora a sequedad añadiendo CH₂Cl₂ (3 x 2 mL) y el residuo resultante se liofiliza, conduciendo a los correspondientes análogos tripeptídicos desprotegidos Gly-dmT-Glu y Gly-Thz-Glu (**38** y **40**) como sólidos blancos. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en las Tablas 5.11 y 5.12.

Eliminación de los grupos protectores Z y Bn de los derivados tripeptídicos 118, 125, 126, 131 y 132:

Los análogos desprotegidos Gly-P^{Me}-Glu, Gly-dmP-Glu, Gly-D-dmP-Glu, Gly-D-Pro-Glu y Gly-D-Pro-D-Glu (**39**, **41-44** respectivamente) se han sintetizado mediante reacción de hidrogenolisis de sus correspondientes tripéptidos *N*- y *C*-protegidos **118**, **125**, **126**, **131** y **132**, según el protocolo general descrito con anterioridad. Así, tras un periodo de 15 horas de reacción, se obtienen los correspondientes derivados tripeptídicos desprotegidos como sólidos blancos, de forma cuantitativa. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en las Tablas 5.11 y 5.12.

Tabla 5.11. Datos analíticos más característicos de los tripéptidos desprotegidos de fórmula general Gly-AA₂-Glu, **38-44**.



Compuesto	AA ₂	Rdto. (%)	P.f. (°C) ^a	$[\alpha]^{20}_D$	EM-ES (m/z)
38	dmT	83	137-140	-66.7 (c 0.5, MeOH)	348 [M ⁺ +1]
39	P ^{Me}	98	142-144	-39.6 (c 0.9, MeOH)	316 [M ⁺ +1]
40	Thz	95	112-115	-71.9 (c 1, H ₂ O)	320 [M ⁺ +1]
41	dmP	99	135-137	-36.9 (c 0.6, MeOH)	330 [M ⁺ +1]
42	D-dmP	99	144-147	+25.1 (c 1, MeOH)	330 [M ⁺ +1]
43	D-Pro	86	215-218	+62.8 (c 0.5, H ₂ O)	302 [M ⁺ +1]
44	D-Pro ^b	94	174-177	+80.4 (c 0.5, H ₂ O)	302 [M ⁺ +1]

a) Compuestos recristalizados en MeOH/Et₂O. b) Fórmula general de **44**: Gly-D-Pro-D-Glu.

TABLA 5.12

5.2.6. SÍNTESIS DE PSEUDOPÉPTIDOS

5.2.6.1. Pseudopéptidos metilenamino $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$

Procedimiento general para la formación del enlace $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ mediante reacción de aminación reductiva:

Sobre una disolución del aminoácido correspondiente *N*-desprotegido (1.10 mmol) en CH_2Cl_2 (7 mL) se adiciona tamiz molecular de 4 Å y Et_3N (1.10 mmol) y se mantiene agitando a t.a. durante 15 minutos. Pasado este tiempo se añade sucesivamente el α -aminoaldehído Boc-Pro-H (**138**) o Boc-Gly-H (**144**) (1.00 mmol), ZnCl_2 (0.50 mmol) y NaBH_3CN (1.10 mmol) y se deja reaccionar a t.a. durante 18 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla se filtra por celita y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo obtenido se disuelve en CH_2Cl_2 (10 mL) y se lava con HCl 0.1 N (10 mL) y disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL), extrayendo en cada caso con más CH_2Cl_2 (2 x 10mL). Se seca la fase orgánica sobre Na_2SO_4 y se evapora el disolvente a presión reducida. La mezcla resultante se purifica mediante cromatografía radial en el eluyente indicado en cada caso.

Boc-Pro $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]\text{Glu}(\text{OBn})\text{-OBn}$ (139):

Se obtiene por reacción de aminación reductiva entre H-Glu(OBn)-OBn·HCl y Boc-Pro-H (**138**) según el procedimiento descrito anteriormente. La purificación mediante cromatografía radial en Hexano/AcOEt (2:1) condujo a la obtención del pseudodipéptido **139** como un aceite (65%). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos se recogen en la Tabla 5.13.

H-ProΨ[CH₂NH]Glu(OBn)-OBn·HCl (140):

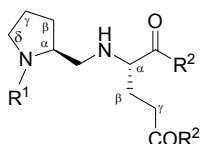
Se obtiene por tratamiento del pseudodipéptido *N*-Boc protegido **139** con una disolución de HCl burbujeado en AcOEt 3.2M como un sirupe tras liofilizar (92%). Los datos espectroscópicos más característicos se recogen en la Tabla 5.13.

Síntesis de los pseudotripéptidos Z-Gly-ProΨ[CH₂NH]Glu(OBn)-OBn (141) y Z-Gly-ProΨ[CH₂N]Glp-OBn (142):

Se obtienen por reacción de acoplamiento entre el pseudodipéptido *N*-desprotegido **140** y Z-Gly-OH siguiendo el protocolo general descrito anteriormente. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía radial en AcOEt/Hexano (10:1) obteniéndose el pseudotripéptido buscado **141** como una espuma (39%, *R_f* = 0.50) y el derivado de piroglutámico **142** como un aceite incoloro (45%, *R_f* = 0.15). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos del análogo **141** se recogen en la Tabla 5.13 y los del análogo **142** se muestran a continuación:

Z-Gly-ProΨ[CH₂N]Glp-OBn (142): Se obtiene como un aceite incoloro en un 45% de rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = -29.0$ (c 0.5, CHCl₃); $^1H\text{-RMN}$ (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.38-7.31 (m, 10H, 2Ph), 5.70 (m, 1H, Gly-NH), 5.20 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.12 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.40 (dd, 1H, *J* = 8.8 y 3.0, Glu-H _{α}), 4.18 (m, 1H, Pro-H _{α}), 3.95 y 3.87 (sist. ABX, 2H, *J* = -17.1, 4.4 y 4.4, Gly-H _{α}), 3.69 (dd, 1H, *J* = -13.9 y 9.3, CH₂N), 3.43 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 3.29 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 3.04 (dd, 1H, *J* = -13.9 y 3.8, CH₂N), 2.48-2.26 (m, 2H, Glu-H _{γ}), 2.30 (m, 1H, Glu-H _{β}), 2.15-1.70 (m, 5H, 2Pro-H _{β} , 2Pro-H _{γ} , Glu-H _{β}); $^{13}C\text{-RMN}$ (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.8 (Glu-CO _{γ}), 171.5 (Glu-CO _{α}), 166.9 (Gly-CO), 156.2 (Z-CO), 136.4 y 135.1 (Ph-C₁), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.4 (Ph), 128.0 (Ph), 66.8 y 66.7 (CH₂-Ph), 59.2 (Glu-C _{α}), 55.6 (Pro-C _{α}), 45.6 (Pro-C _{δ}), 43.4 (Gly-C _{α}), 43.2 (CH₂N), 29.2 (Glu-C _{γ}), 27.9 (Pro-C _{β}), 23.6 (Glu-C _{β}), 23.1 (Pro-C _{γ}); **EM-ES** (m/z): 516 (68) [M⁺+Na], 494 (100) [M⁺+1].

Tabla 5.13. Datos analíticos y espectroscópicos más característicos de los pseudotripéptidos **133** y **139-141**.



	139	140	141	133
R ¹	Boc	H	Z-Gly	H-Gly
R ²	OBn	OBn	OBn	OH
Rdto. (%)	65	92	39	99
P.f. (°C)	Aceite	Sirupe	Espuma	42-45 ^e
[α] _D ²⁰	N.D.	N.D.	-34.0 (c 0.6, CHCl ₃)	-19.1 (c 1.5, MeOH)
EM-ES (m/z)	511 [M ⁺ +1]	411 [M ⁺ +1]	602 [M ⁺ +1]	315 [M ⁺ +1]
¹H-RMN^{a, b}				
R ₁	1.42 (s) ^c	---	3.93 y 3.86 (ABX, -17.2, 7.5, 4.5) ^d	3.77 y 3.72 (AB, -16.7) ^d
Pro				
H _α	3.68 (m)	4.54 (m)	4.11 (m)	4.26 (m)
CH ₂ -NH	2.59-2.52 (m)	3.92 y 3.38 (m)	2.66 y 2.59 (ABX, -11.6, 4.5, 4.5)	2.99 y 2.97 (ABX, -12.1, 7.2, 3.9)
H _δ	3.43-3.19 (m)	3.51 y 3.42 (m)	3.41-3.23 (m)	3.44-3.26 (m)
Glu				
H _α	3.25 (m)	4.36 (m)	3.32 (m)	3.42 (dd, 6.5, 4.3)
H _γ	2.48 (t, 7.6)	2.70 y 2.48 (m)	2.46 (t, 7.6)	2.23-2.12 (m)
¹³C-RMN^a				
R ₁				
CO	154.6	---	166.8	167.9
C _α	28.5	---	43.5	40.8
Pro				
C _α	57.0	56.6	57.6	55.6
CH ₂ -NH	50.7	47.3	49.5	50.4
Glu				
CO _α / CO _γ	173.0 / 174.8	168.0 / 171.8	172.8 / 174.7	173.8 / 181.8
C _α	60.6	59.9	60.7	63.1

a) Los espectros de **139** y **140** fueron realizados en muestras disueltas en CDCl₃ a 300 MHz para ¹H-RMN y 75 MHz y a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN para **141**. Los espectros de **133** fueron realizados en muestras disueltas en H₂O/D₂O a 500 MHz para ¹H-RMN y 125 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. b) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). c) Desplazamiento químico del grupo ¹Bu. d) Desplazamiento químico de los H_α de la Gly. e) Compuesto recrystallizado en MeOH/Et₂O.

Eliminación de los grupos protectores Z y Bn de los pseudotripéptidos Z-Gly-ProΨ[CH₂NH]Glu(OBn)-OBn (141) y Z-Gly-ProΨ[CH₂N]Glu-OBn (142):

Cada uno de los pseudotripéptidos protegidos **141** ó **142** se hidrogena durante 2.5 horas, según el procedimiento general descrito, se filtra el catalizador por celita y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en fase reversa utilizando un gradiente de Acetonitrilo en Agua (0-10%), para obtener el correspondiente pseudotripéptido desprotegido **133** ó **143**. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos del análogo **133** se recogen en la Tabla 5.13, mientras que los del derivado de piroglutámico **143** se recogen a continuación:

H-Gly-ProΨ[CH₂N]Glp-OH (143): Se obtiene a partir de **142** como una espuma (97%). $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -36.2$ (c 0.6, CHCl₃); ¹H-RMN (400 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 4.14 (m, 1H, Pro-H_α), 4.01 (dd, 1H, *J* = 8.7 y 4.1, Glu-H_α), 3.67 (s, 2H, Gly-H_α), 3.44 (dd, 1H, *J* = -14.0 y 8.2, CH₂N), 3.32 (m, 1H, Pro-H_δ), 3.20 (m, 1H, Pro-H_δ), 2.85 (dd, 1H, *J* = -14.0, 5.2, CH₂N), 2.32-2.11 (m, 3H, Glu-H_β, 2Glu-H_γ), 1.88-1.63 (m, 4H, Pro-H_β, 2Pro-H_γ, Glu-H_β), 1.55 (m, 1H, Pro-H_β); ¹³C-RMN (100 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 179.5 (Glu-CO_γ), 179.4 (Glu-CO_α), 165.8 (Gly-CO), 63.4 (Glu-C_α), 55.8 (Pro-C_α), 46.1 (Pro-C_δ), 43.1 (CH₂N), 40.6 (Gly-C_α), 29.9 (Glu-C_γ), 27.3 (Pro-C_β), 23.3 (Glu-C_β), 23.0 (Pro-C_γ); *EM-ES* (m/z): 270 (100) [M⁺+1].

Síntesis del pseudotripéptido Boc-GlyΨ[CH₂N]Pro-Glu(O^tBu)-O^tBu (146):

Se obtiene por reacción de aminación reductiva entre Boc-Gly-H (**144**) y H-Pro-Glu(O^tBu)-O^tBu (**145**) durante 21 horas, según el procedimiento descrito anteriormente. En este caso no es necesaria la adición de Et₃N. Posteriormente, el residuo resultante se purifica mediante cromatografía radial en DCM/MeOH (30:1) obteniendo el pseudotripéptido **146** como un aceite incoloro (37%). $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -10.7$ (c 1, CHCl₃); ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.89 (d, 1H, *J* = 9.2, Glu-NH), 5.83 (m, 1H, Gly-NH), 4.48 (dt, 1H, *J* = 9.2 y 4.4, Glu-H_α), 3.43 (m, 1H, CH₂NH), 3.29 (m, 1H, Pro-H_δ), 3.04 (dd, 1H, *J* = 10.1 y 4.6, Pro-H_α), 3.01 (m, 1H, CH₂NH), 2.72 (m, 1H, N-CH₂), 2.60 (m, 1H, N-CH₂), 2.40-2.07 (m, 5H, Pro-H_δ, Pro-H_β, Glu-H_β, 2Glu-H_γ), 1.98-1.65 (m, 4H, Pro-

H_β, 2Pro-H_γ, Glu-H_β), 1.45, 1.42 y 1.41 (3s, 27H, ^tBu); ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.0 (Pro-CO), 172.1 (Glu-CO_γ), 171.8 (Glu-CO_α), 156.5 (Boc-CO), 82.5, 81.9 y 80.7 (C-(CH₃)₃), 67.5 (Pro-C_α), 55.1 (N-CH₂), 53.9 (Pro-C_δ), 51.2 (Glu-C_α), 39.6 (CH₂NH), 31.7 (Glu-C_γ), 30.7 (Pro-C_β), 28.4, 28.0 y 27.9 (C-(CH₃)₃), 28.0 (Glu-C_β), 24.3 (Pro-C_γ); **EM-ES** (m/z): 522 (15) [M⁺+Na], 500 (100) [M⁺+1].

H-GlyΨ[CH₂N]Pro-Glu-OH-CF₃CO₂H (134):

Se obtiene a partir del derivado protegido **146** mediante eliminación simultánea de los grupos Boc y ^tBu, siguiendo el procedimiento general descrito, durante 7 horas. Transcurrido este tiempo el disolvente se evapora a sequedad y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía en fase reversa utilizando como eluyente un gradiente de Acetonitrilo en Agua (0-10%). Posteriormente se liofiliza para dar el análogo desprotegido **134** como un sirupe (93%). [α]_D²⁰ = -19.6 (c 1.2, H₂O); ¹H-RMN (300 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 8.69 (d, 1H, *J* = 7.1, Glu-NH), 4.29 (ddd, 1H, *J* = 8.7, 7.1 y 5.4, Glu-H_α), 4.22 (t, 1H, *J* = 8.2, Pro-H_α), 3.70 (m, 1H, Pro-H_δ), 3.49-3.36 (m, 2H, N-CH₂), 3.22 (t, 2H, *J* = 7.1, CH₂NH₂), 3.14 (m, 1H, Pro-H_δ), 2.45 (m, 1H, Pro-H_β), 2.32 (t, 2H, *J* = 7.6, Glu-H_γ), 2.12-1.82 (m, 5H, Pro-H_β, 2Pro-H_γ, 2Glu-H_β); ¹³C-RMN (75 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 177.4 (Glu-CO_γ), 175.3 (Glu-CO_α), 168.7 (Pro-CO), 68.3 (Pro-C_α), 55.5 (Pro-C_δ), 53.5 (Glu-C_α), 51.4 (N-CH₂), 35.5 (CH₂NH₂), 30.5 (Glu-C_γ), 29.1 (Pro-C_β), 25.9 (Glu-C_β), 22.7 (Pro-C_γ); **EM-ES** (m/z): 288 (100) [M⁺+1].

Síntesis del pseudodipéptido Boc-GlyΨ[CH₂N]Pro-OMe (178):

A una disolución de de H-Pro-OMe·HCl (150 mg, 0.91 mmol) y *N*-(2-bromoetil)carbamato de *terc*-butilo (305 mg, 1.36 mmol) en 5 mL de CH₃CN anhidro se añaden 315 μL (2.26 mmol) de Et₃N y se deja reaccionar la mezcla a reflujo durante 48 horas. Pasado este tiempo se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se disuelve en CH₂Cl₂ (10 mL). Se lava con una disolución de ácido cítrico al 10% (10 mL) y posteriormente se neutraliza a pH=7 con NaHCO₃ (10%) para extraer con más CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Se juntan los extractos orgánicos, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Finalmente, el residuo obtenido se purifica

mediante cromatografía radial en AcOEt/Hexano (2:1) obteniendo el dipéptido **178** como un sólido (68%). **P.f.** 154-157 °C (MeOH/Et₂O); $[\alpha]^{20}_D = -31.2$ (c 0.9, CHCl₃); $[\alpha]^{20}_D$ lit.¹⁴⁷ = -34.1 (c 1, CHCl₃) **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.26 (m, 1H, Gly-NH), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.27-3.09 (m, 4H, Pro-H _{α} , Pro-H _{δ} , CH₂NH), 2.72-2.60 (m, 2H, N-CH₂), 2.38 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 2.22-1.73 (m, 4H, 2Pro-H _{β} , 2Pro-H _{γ}), 1.43 (s, 9H, ^tBu).

H-GlyΨ[CH₂N]Pro-OMe-HCl (179):

Se obtiene por tratamiento del dipéptido *N*-Boc protegido **178** con una disolución de HCl burbujeado en AcOEt 3.2M durante 1 hora, según el procedimiento general descrito previamente, como un sólido céreo en un 98% de rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = -38.3$ (c 1.1, MeOH); **¹H-RMN** (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 4.35 (dd, 1H, *J* = 9.7 y 7.3, Pro-H _{α}), 3.67 (s, 3H, OMe), 3.75-3.07 (m, 6H, 2Pro-H _{δ} , CH₂NH, N-CH₂), 2.40 (m, 1H, Pro-H _{β}), 2.15-1.94 (m, 2H, Pro-H _{β} , Pro-H _{γ}), 1.87 (m, 1H, Pro-H _{γ}); **¹³C-RMN** (75 MHz, D₂O) δ (ppm): 172.5 (Pro-CO), 69.1 (Pro-C _{α}), 56.1 (N-CH₂), 51.7 (Pro-C _{δ}), 50.9 (OMe), 35.6 (CH₂NH), 28.7 (Pro-C _{β}), 23.1 (Pro-C _{γ}); **EM-ES** (m/z): 173 (100) [M⁺+1].

Síntesis del pseudodipéptido Boc-ProΨ[CH₂NH]Gly-OMe (187)¹⁴⁸:

Se sintetiza mediante condensación entre el α-aminoaldehído Boc-Pro-H (**138**) e hidrocloreuro de H-Gly-OMe en MeOH, siguiendo el procedimiento general descrito de aminación reductiva. La purificación mediante cromatografía radial en AcOEt (100%) condujo a la obtención del pseudodipéptido **187** como un sirupe (79%). $[\alpha]^{20}_D = -37.9$ (c 1, CHCl₃); **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.78 (m, 1H, Pro-H _{α}), 3.71 (s, 2H, Gly-H _{α}), 3.42 (s, 3H, OMe), 3.35-3.25 (m, 2H, Pro-H _{δ}), 2.77 (m, 1H, CH₂NH), 2.58 (m, 1H, CH₂NH), 2.01-1.75 (m, 4H, 2Pro-H _{β} , 2Pro-H _{γ}), 1.46 (s, 9H, ^tBu); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.9 (Gly-CO), 156.6 (Boc-CO), 79.6 (C-(CH₃)₃), 57.0 (Pro-C _{α}), 52.6 (CH₂NH), 51.7 (Gly-C _{α}), 50.9 (OMe), 46.4 (Pro-C _{δ}), 29.7 (Pro-C _{β}), 28.5 (C-(CH₃)₃), 23.0 (Pro-C _{γ}); **EM-ES** (m/z): 295 (11) [M⁺+Na], 273 (100) [M⁺+1].

H-ProΨ[CH₂NH]Gly-OMe-HCl (188):

Se obtiene por tratamiento del dipéptido *N*-Boc protegido **187** con disolución de HCl burbujeado en AcOEt 3.2M, siguiendo el protocolo general descrito, como un sólido amorfo (98%). $[\alpha]_D^{20} = +3.9$ (c 1.1, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 3.96 (s, 2H, Gly-H _{α}), 3.83 (m, 1H, Pro-H _{α}), 3.68 (s, 3H, OMe), 3.47-3.33 (m, 2H, CH₂NH), 3.30-3.22 (m, 2H, Pro-H _{δ}), 2.21 (m, 1H, Pro-H _{β}), 2.04-1.83 (m, 2H, Pro-H _{γ}), 1.68 (m, 1H, Pro-H _{β}); $^{13}\text{C-RMN}$ (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 167.8 (Gly-CO), 56.5 (Pro-C _{α}), 54.0 (OMe), 48.2 (Gly-C _{α}), 48.0 (CH₂NH), 46.6 (Pro-C _{δ}), 28.9 (Pro-C _{β}), 23.1 (Pro-C _{γ}); **EM-ES** (m/z): 173 (100) [M⁺+1].

5.2.6.2. Pseudopéptidos cianometilenamino Ψ[CH(CN)NH]***Procedimiento general para la formación del enlace Ψ[CH(CN)NH] mediante reacción de Strecker modificada:***

Sobre una disolución del aminoácido correspondiente *N*-desprotegido (3.00 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (20 mL) enfriada a -20 °C se adiciona Et₃N (3.00 mmol) y se mantiene agitando durante 15 minutos bajo atmósfera inerte. Pasado este tiempo se añade el α-aminoaldehído Boc-Pro-H (**138**) o Boc-Gly-H (**144**) (2.00 mmol) y ZnCl₂ (2.00 mmol) y se deja reaccionar a la misma temperatura durante 2 horas. A continuación, se añade TMSCN (2.60 mmol) y se agita a 0 °C durante 24 horas más. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se lava con H₂O (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). Se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. La mezcla resultante se purifica mediante cromatografía en columna utilizando el eluyente indicado en cada caso.

Síntesis de los pseudodipéptidos Boc-ProΨ[CH(CN)NH]Glu(OBn)-OBn [(R)- y (S)-147]:

Se obtienen siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente, entre H-Glu(OBn)-OBn·HCl y el α-aminoaldehído Boc-Pro-H (**138**). El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna en DCM/AcOEt (20:1) obteniendo los diastereoisómeros (**R**)-**147** (51%, $R_f = 0.60$) y (**S**)-**147** (28%, $R_f = 0.50$) en una proporción *R:S* de 58:42 medida en el espectro de ^1H -RMN del bruto de reacción. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en la Tabla 5.14.

Síntesis de los pseudodipéptidos N-desprotegidos H-ProΨ[CH(CN)NH]Glu(OBn)-OBn·HCl [(R)- y (S)-148]:

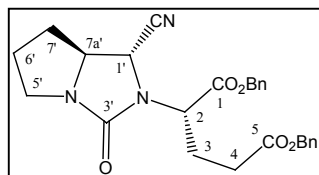
Se obtienen por tratamiento del correspondiente pseudodipéptido *N*-protegido (**R**)- o (**S**)-**147** con una disolución de HCl burbujeado en AcOEt 3.2M durante 3 horas, sin necesidad de purificación adicional. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en la Tabla 5.14.

Síntesis de las 2-oxoimidazolidinas (R)- y (S)-149:

A una suspensión del correspondiente pseudopéptido Ψ[CH(CN)NH] *N*-desprotegido (**R**)- o (**S**)-**148** (0.10 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (5 mL) se añade Et_3N (0.20 mmol) y se agita a t.a. durante 10 minutos. A continuación, se enfría la mezcla a 0 °C y se añade carbonato de bis(triclorometilo) (0.04 mmol) y Et_3N (0.24 mmol) manteniendo la mezcla de reacción durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se lava la mezcla de reacción sucesivamente con H_2O (5 mL) y disolución saturada de NaCl (5 mL), se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía radial en AcOEt/Hexano (2:3) obteniendo las correspondientes 2-oxoimidazolidinas (**R**)- y (**S**)-**149**. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen a continuación:

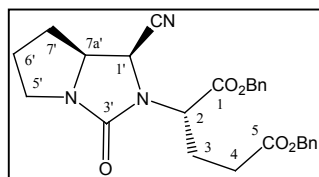
TABLA 5.14

Ácido (2S)-2-((1'R,7a'S)-1'-ciano-tetrahidro-3'-oxo-1H-pirrolo[1,2-e]imidazol-2'-(3H)-il)-pentanodiato de dibencilo [(R)-149]: Se obtiene como un sirupe en un 43% de



rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = -7.4$ (c 0.8, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.38-7.29 (m, 10H, 2Ph), 5.13 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.12 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.77 (dd, 1H, $J = 11.5$ y 4.4, H_2), 4.63 (d, 1H, $J = 2.4$, $\text{H}_{1'}$), 3.86 (m, 1H, $\text{H}_{7a'}$), 3.66 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 3.09 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 2.66 (m, 1H, H_4), 2.60-2.44 (m, 2H, H_3 , H_4), 2.22 (m, 1H, H_3), 2.02 (m, 1H, H_7), 2.95-1.73 (m, 2H, H_6), 1.44 (m, 1H, H_7); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.9 (C_5), 170.6 (C_1), 162.4 (C_3), 135.7 y 134.7 (Ph- C_1), 128.7 (Ph), 128.6 (Ph), 128.5 (Ph), 128.3 (Ph), 128.2 (Ph), 118.3 (CN), 67.5 y 66.5 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 62.0 ($\text{C}_{7a'}$), 54.8 (C_2), 46.5 ($\text{C}_{1'}$), 45.5 (C_5), 30.6 (C_4), 29.7 (C_7), 24.7 (C_3), 24.0 (C_6); **EM-ES** (m/z): 484 (38) [$\text{M}^+\text{+Na}$], 462 (100) [$\text{M}^+\text{+1}$].

Ácido (2S)-2-((1'S,7a'S)-1'-ciano-tetrahidro-3'-oxo-1H-pirrolo[1,2-e]imidazol-2'-(3H)-il)-pentanodiato de dibencilo [(S)-149]: Se obtiene como una espuma en un 73% de



de rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = -69.1$ (c 0.5, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.37-7.33 (m, 10H, 2Ph), 5.24-5.06 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.68 (d, 1H, $J = 8.4$, $\text{H}_{1'}$), 4.33 (m, 1H, H_2), 3.84 (m, 1H, $\text{H}_{7a'}$), 3.64 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 3.11 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 2.58-2.44 (m, 3H, H_3 , 2 H_4), 2.40 (m, 1H, H_3), 2.08-1.78 (m, 3H, H_7 , 2 H_6), 1.65 (m, 1H, H_7); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.4 (C_5), 169.7 (C_1), 161.6 (C_3), 135.6 y 135.0 (Ph- C_1), 128.7 (Ph), 128.7 (Ph), 128.5 (Ph), 128.1 (Ph), 114.8 (CN), 67.7 y 66.7 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 58.0 ($\text{C}_{7a'}$), 56.0 (C_2), 47.9 ($\text{C}_{1'}$), 46.2 (C_5), 30.7 (C_4), 28.6 (C_7), 24.5 (C_6), 23.8 (C_3); **EM-ES** (m/z): 484 (100) [$\text{M}^+\text{+Na}$], 462 (51) [$\text{M}^+\text{+1}$].

Síntesis de los pseudotripéptidos Z-Gly-Pro Ψ [CH(CN)NH]Glu(OBn)-OBn [(R)- y (S)-150] y Z-Gly-Pro Ψ [CH(CN)N]Glp-OBn [(R)- y (S)-151]:

Se obtienen por reacción de acoplamiento de acuerdo con el procedimiento general descrito, entre el pseudodipéptido *N*-desprotegido (R)- o (S)-148 y Z-Gly-OH manteniendo la mezcla de reacción durante 2.5 horas. La purificación del residuo

resultante mediante cromatografía radial en AcOEt/Hexano (6:1) conduce al correspondiente pseudotripéptido (*R*)- o (*S*)-**150** ($R_f = 0.75$ y 0.70 respectivamente) y a los correspondientes productos resultantes de la lactamización del glutámico, (*R*)- o (*S*)-**151** ($R_f = 0.15$ y 0.20 respectivamente). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de los derivados (*R*)- y (*S*)-**150** se recogen en la Tabla 5.14, mientras que los de los derivados de piroglutámico (*R*)- y (*S*)-**151** se muestran a continuación:

Z-Gly-ProΨ[(R)CH(CN)N]Glp-OBn [(R)-151]: Se obtiene como una espuma con un 68% de rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = -61.2$ (c 1, CHCl₃); 1H -RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.40-7.30 (m, 10H, 2Ph), 5.73 (m, 1H, Gly-NH), 5.22 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.19 (d, 1H, $J = 3.9$, CHCN), 5.11 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.38 (dd, 1H, $J = 8.7$ y 2.3 , Glu-H _{α}), 4.26 (m, 1H, Pro-H _{α}), 4.01 y 3.92 (sist. ABX, 2H, $J = -17.4$, 4.7 y 4.3 , Gly-H _{α}), 3.48 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 3.32 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 2.51-2.29 (m, 3H, Glu-H _{β} , 2Glu-H _{γ}), 2.29-2.19 (m, 2H, Pro-H _{β} , Pro-H _{γ}), 2.13 (m, 1H, Glu-H _{β}), 1.93-1.78 (m, 2H, Pro-H _{β} , Pro-H _{γ}); ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.2 (Glu-CO _{γ}), 171.0 (Glu-CO _{α}), 168.4 (Gly-CO), 156.2 (Z-CO), 136.3 y 134.7 (Ph-C₁), 128.7 (Ph), 128.7 (Ph), 128.5 (Ph), 128.1 (Ph), 114.9 (CN), 67.7 y 66.9 (CH₂-Ph), 59.9 (Glu-C _{α}), 58.9 (Pro-C _{α}), 46.8 (CHCN), 45.8 (Pro-C _{δ}), 43.6 (Gly-C _{α}), 28.7 (Glu-C _{γ}), 27.7 (Pro-C _{β}), 24.0 (Glu-C _{β}), 23.8 (Pro-C _{γ}); *EM-ES* (m/z): 541 (100) [M⁺+Na], 519 (45) [M⁺+1].

Z-Gly-ProΨ[(S)CH(CN)N]Glp-OBn [(S)-151]: Se obtiene como un aceite incoloro con un 64% de rendimiento. $[\alpha]^{20}_D = -57.6$ (c 0.9, CHCl₃); 1H -RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.40-7.29 (m, 10H, 2Ph), 5.64 (m, 1H, Gly-NH), 5.22 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.12 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.09 (d, 1H, $J = 4.1$, CHCN), 4.40 (dd, 1H, $J = 8.6$ y 2.1 , Glu-H _{α}), 4.28 (m, 1H, Pro-H _{α}), 4.01 y 3.91 (sist. ABX, 2H, $J = -17.4$, 4.5 y 4.2 , Gly-H _{α}), 3.49 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 3.36 (m, 1H, Pro-H _{δ}), 2.52-2.27 (m, 3H, Glu-H _{β} , 2Glu-H _{γ}), 2.22 (m, 1H, Pro-H _{β}), 2.16 (m, 1H, Pro-H _{γ}), 1.98-1.84 (m, 3H, Pro-H _{β} , Pro-H _{γ} , Glu-H _{β}); ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.9 (Glu-CO _{γ}), 171.0 (Glu-CO _{α}), 168.2 (Gly-CO), 156.2 (Z-CO), 136.3 y 134.7 (Ph-C₁), 128.8 (Ph), 128.7 (Ph), 128.5 (Ph), 128.1 (Ph), 114.9 (CN), 67.7 y 66.9 (CH₂-Ph), 60.0 (Glu-C _{α}), 59.1 (Pro-C _{α}), 47.0 (CHCN), 46.0 (Pro-C _{δ}),

43.6 (Gly-C α), 28.8 (Glu-C γ), 27.8 (Pro-C β), 24.1 (Glu-C β), 23.8 (Pro-C γ); **EM-ES** (m/z): 519 (100) [M⁺+1].

Eliminación de los grupos protectores Z y Bn de los diastereoisómeros Z-Gly-ProΨ[CH(CN)N]Glp-OBn [(R)- y (S)-151]:

Cada uno de los pseudotripéptidos protegidos (**(R)-** o **(S)-151**) se hidrogena según el procedimiento descrito anteriormente, durante 4 horas. Tras filtrar el catalizador, el residuo obtenido se purifica por cromatografía en fase reversa utilizando un gradiente de Acetonitrilo en Agua (0-10%), obteniendo el correspondiente pseudotripéptido desprotegido (**(R)-** o **(S)-152**). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se muestran a continuación:

H-Gly-ProΨ[(R)CH(CN)N]Glp-OH [(R)-152]: Se obtiene como una espuma (70%). $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -16.2$ (c 1, MeOH); **¹H-RMN** (400 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 4.58 (m, 1H, CHCN), 4.49 (m, 1H, Pro-H α), 3.93 (dd, 1H, $J = 9.0$ y 3.3 , Glu-H α), 3.75 (s, 2H, Gly-H α), 3.37 (m, 1H, Pro-H δ), 3.29 (m, 1H, Pro-H δ), 2.31-2.14 (m, 3H, Pro-H β , 2Glu-H γ), 2.03-1.75 (m, 5H, Pro-H β , 2Pro-H γ , 2Glu-H β); **¹³C-RMN** (100 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 179.1 (Glu-CO γ), 178.5 (Glu-CO α), 166.8 (Gly-CO), 115.8 (CN), 64.1 (Glu-C α), 57.6 (Pro-C α), 47.3 ($\underline{\text{CHCN}}$), 46.4 (Pro-C δ), 40.7 (Gly-C α), 29.6 (Glu-C γ), 27.5 (Pro-C β), 23.8 (Glu-C β), 23.2 (Pro-C γ); **EM-ES** (m/z): 295 (100) [M⁺+1].

H-Gly-ProΨ[(S)CH(CN)N]Glp-OH [(S)-152]: Se obtiene como un sólido amorfo (92%). $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -45.8$ (c 0.4, MeOH); **¹H-RMN** (400 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 4.60 (m, 1H, CHCN), 4.51 (m, 1H, Pro-H α), 3.95 (dd, 1H, $J = 9.0$ y 3.9 , Glu-H α), 3.78 (s, 2H, Gly-H α), 3.39 (m, 1H, Pro-H δ), 3.31 (m, 1H, Pro-H δ), 2.35-2.16 (m, 3H, Pro-H β , 2Glu-H γ), 2.03-1.79 (m, 5H, Pro-H β , 2Pro-H γ , 2Glu-H β); **¹³C-RMN** (100 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 179.2 (Glu-CO γ), 178.6 (Glu-CO α), 166.9 (Gly-CO), 115.9 (CN), 64.2 (Glu-C α), 57.7 (Pro-C α), 47.4 ($\underline{\text{CHCN}}$), 46.4 (Pro-C δ), 40.7 (Gly-C α), 29.6 (Glu-C γ), 27.6 (Pro-C β), 23.8 (Glu-C β), 23.3 (Pro-C γ); **EM-ES** (m/z): 295 (100) [M⁺+1].

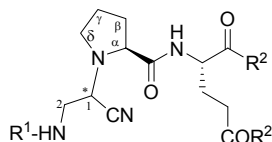
Síntesis de Boc-GlyΨ[CH(CN)N]Pro-Glu(O^tBu)-O^tBu [(R)- y (S)-153]:

Para la formación de los pseudotripéptidos (R)- y (S)-**153** se sigue el procedimiento general descrito anteriormente para la reacción de hidrocianación de Strecker modificada, entre H-Pro-Glu(O^tBu)-O^tBu (**145**) y Boc-Gly-H (**144**). El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna en Éter/Hexano (10:1) conduciendo a los diastereoisómeros (S)-**153** (13%, $R_f = 0.80$) y (R)-**153** (19%, $R_f = 0.70$) en una proporción 41:59 medida por ¹H-RMN del crudo de reacción. En esta reacción se recupera parte del producto de partida **145** (64%). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en la Tabla 5.15.

Síntesis de H-GlyΨ[CH(CN)N]Pro-Glu-OH·CF₃CO₂H, [(R)- y (S)-136]:

A una disolución del correspondiente pseudotripéptido protegido (R)- o (S)-**153** se añade TFA, según el protocolo general descrito anteriormente para la eliminación del grupo Boc y de los ésteres *tert*-butílicos, y se deja la mezcla reaccionar a t.a. durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evapora a sequedad añadiendo más CH₂Cl₂ (3 x 2 mL) para eliminar las trazas de TFA y el residuo resultante se liofiliza conduciendo a los correspondientes pseudotripéptidos desprotegidos H-GlyΨ[CH(CN)N]Pro-Glu-OH, (R)- o (S)-**136**, de manera cuantitativa. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos derivados se recogen en la Tabla 5.15.

Tabla 5.15. Datos analíticos y espectroscópicos más característicos de los pseudotripéptidos GlyΨ[CH(CN)N]Pro-Glu, (*R*)-, (*S*)-**136** y (*R*)-, (*S*)-**153**.



	(<i>R</i>)- 153	(<i>S</i>)- 153	(<i>R</i>)- 136	(<i>S</i>)- 136
R ¹ / R ²	Boc / O ^t Bu	Boc / O ^t Bu	H / OH	H / OH
Rdto. (%)	19	13	98	99
P.f. (°C) ^a	Aceite	98-101	Sirupe	Sirupe
[α] _D ²⁰	-32.0 (c 1, CHCl ₃)	-2.0 (c 1, CHCl ₃)	N.D.	N.D.
EM-ES (m/z)	525 [M ⁺ +1]	525 [M ⁺ +1]	313 [M ⁺ +1]	313 [M ⁺ +1]
¹H-RMN^{b, c}				
Gly				
NH	5.80 (m)	6.71 (m)	---	---
H ₁	3.89 (dd, 10.4, 4.8)	4.16 (dd, 10.3, 3.5)	4.27 (dd, 9.5, 4.9)	4.23 (dd, 8.8, 4.9)
H ₂	3.76 (m) y 3.42 (dt, -14.0, 4.5)	3.95 y 3.58 (m)	3.25-3.11 (m)	3.20 y 3.00 (m)
Pro				
H _α	3.38 (dd, 9.5, 5.3)	3.50 (d, 9.7)	3.31 (dd, 9.6, 4.3)	3.39 (dd, 10.3, 2.9)
H _δ	3.31 y 2.72 (m)	3.27 y 3.82 (m)	2.97 y 2.46 (m)	3.05 y 2.59 (m)
Glu				
NH	7.54 (d, 9.3)	7.65 (d, 8.6)	8.31 (d, 8.3)	8.35 (d, 8.2)
H _α	4.48 (dt, 9.5, 3.8)	4.45 (dt, 8.8, 4.6)	4.17 (m)	4.18 (m)
H _γ	2.32-2.19 (m)	2.35-2.14 (m)	2.26 (t, 7.3)	2.26 (t, 7.3)
¹³C-RMN^b				
Gly				
CN	115.7	116.7	115.2	115.6
C ₁	54.2	55.6	52.5	52.9
C ₂	41.5	42.4	39.3	39.8
Pro				
CO	172.0	171.8	174.9	174.9
C _α	65.8	62.4	65.9	62.7
C _δ	48.0	55.0	48.3	54.2
Glu				
CO _α / CO _γ	172.0 / 173.1	172.5 / 174.1	177.1 / 177.2	177.1 / 177.3
C _α	51.5	51.9	51.8	51.9

a) Compuestos recristalizados en MeOH/Et₂O. b) Los espectros de (*R*)-, (*S*)-**136** y (*R*)-, (*S*)-**153** fueron realizados a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN en muestras disueltas en H₂O/D₂O y en CDCl₃ respectivamente. Valores de desplazamiento químico en ppm. c) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz).

Síntesis de Boc-GlyΨ[CH(CN)NH]Glu(O^tBu)-OMe [(R,S)-154]:

Se obtiene al hacer reaccionar el clorhidrato de H-Glu(O^tBu)-OMe y Boc-Gly-H (**144**) durante 22 horas, siguiendo el procedimiento descrito para la reacción de hidrocianación de Strecker modificada. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna en AcOEt/Hexano (1:2) obteniéndose la mezcla de los dos diastereoisómeros como un aceite incoloro (87%) en una proporción 47:53 medido en el crudo de reacción por ¹H-RMN. Los intentos de separación cromatográfica de los mismos fueron infructuosos. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.13 (m, 1H, Gly-NH), 4.37 (t, 1H, *J* = 5.8, CHCN-min), 3.77 (s, 3H, OMe-May), 3.74 (s, 3H, OMe-min), 3.71 (m, 1H, CHCN-May), 3.53-3.30 (m, 6H, 4Gly-H_α, 2Glu-H_α), 2.49-2.38 (m, 2H, Glu-H_γ-min), 2.35-2.26 (m, 2H, Glu-H_γ-May), 2.09 (m, 1H, Glu-NH), 2.11-1.72 (m, 4H, Glu-H_β), 1.49-1.39 (m, 36H, ^tBu); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.0 (Glu-CO_γ-May), 173.9 (Glu-CO_γ-min), 172.1 (Glu-CO_α), 155.7 (Boc-CO), 118.4 (CN-min), 118.3 (CN-May), 80.1 (C-(CH₃)₃), 58.9 (Glu-C_α-min), 57.8 (Glu-C_α-May), 52.2 (OMe-min), 52.1 (OMe-May), 49.8 (CHCN-min), 49.3 (CHCN-May), 43.0 (Gly-C_α), 31.2 (Glu-C_γ), 28.2 (Glu-C_β), 28.0 (C-(CH₃)₃ [CO₂^tBu]), 27.9 (C-(CH₃)₃ [Boc]); **EM-ES** (m/z): 386 (100) [M⁺+1].

Reducción del grupo ciano de los pseudodipéptidos Ψ[CH(CN)NH] (R,S)-154. Síntesis de Boc-GlyΨ[CH(CH₂NH₂)NH]Glu(O^tBu)-OMe [(R,S)-155]:^{§§}

A una disolución de los pseudodipéptidos cianometilenamino (**R,S**)-**154** (159 mg, 0.41 mmol) en 10 mL de MeOH se le añade ácido acético (21 μL, 0.41 mmol) y se hidrogena en presencia de Pd(C) al 10% (240 mg, 150% en peso) a 1 atm de presión de H₂ y a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación se filtra el catalizador por celita, se evapora el disolvente a vacío y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía en columna en DCM/MeOH (10:1) aislando la mezcla de ambos pseudopéptidos reducidos (**R,S**)-**155** como un aceite incoloro (44%) y sus correspondientes 2-oxopiperazinas (**R**)- y (**S**)-**156** en un 8% y 10% de rendimiento

^{§§} Hay que señalar que, en los compuestos resultantes de la hidrogenación de pseudopéptidos cianometilenamino, el orden de prelación de los sustituyentes sobre el centro estereogénico del enlace pseudopeptídico cambia, de forma que los epímeros (*R*), tras la reducción del grupo CN, dan lugar a epímeros de configuración (*S*), y viceversa.

respectivamente. Los datos espectroscópicos de la mezcla (**R,S**)-**155** se detallan a continuación: $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.74-5.59 (m, 2H, Boc-NH), 3.73 (s, 3H, OMe-min), 3.72 (s, 3H, OMe-May), 3.47 (dd, 1H, $J = 7.5$ y 5.0 , Glu- H_α -min), 3.35 (dd, 1H, $J = 8.6$ y 5.1 , Glu- H_α -May), 3.27-3.20 (m, 4H, Gly- H_α), 3.14-2.88 (m, 6H, $2\text{CHCH}_2\text{NH}_2$, $4\text{CHCH}_2\text{NH}_2$), 2.47-2.24 (m, 4H, Glu- H_γ), 1.97 (m, 2H, Glu- H_β), 1.84 (m, 2H, Glu- H_β), 1.44-1.38 (m, 36H, ^tBu); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 175.7 (Glu- CO_γ), 172.4 (Glu- CO_α), 157.2 (Boc-CO), 80.6 y 80.0 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$), 58.8 (Glu- C_α -May), 58.4 (Glu- C_α -min), 54.6 (CHCH_2NH_2 -May), 54.5 (CHCH_2NH_2 -min), 52.6 (OMe-min), 52.4 (OMe-May), 41.1 (Gly- C_α), 40.1 (CHCH_2NH_2), 31.8 (Glu- C_γ), 28.5 (Glu- C_β), 28.4 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$ [CO_2^tBu]), 28.1 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$ [Boc]); **EM-ES** (m/z): 390 (100) [$\text{M}^+ + 1$].

Síntesis de Boc-Gly Ψ [CH(CN)N]Pro-OMe [(R,S)-(181)]:

Para la síntesis de los pseudodipéptidos (**R,S**)-**181** se sigue el procedimiento general descrito anteriormente de la reacción de hidrocianación de Strecker, entre H-Pro-OMe·HCl y el α -aminoaldehído Boc-Gly-H (**144**) dejando la mezcla reaccionar durante 3 horas. A continuación, se añade TMSCN y se agita durante 24 horas más. Transcurrido este tiempo se trata la reacción según el procedimiento descrito y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía en columna en AcOEt/Hexano (1:2) obteniendo los diastereoisómeros (**S**)-**181** (17%, $\text{R}_f = 0.47$) y (**R**)-**181** (36%, $\text{R}_f = 0.39$) en una proporción 35:65 medida en el bruto de reacción por $^1\text{H-RMN}$. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en Tabla 5.16.

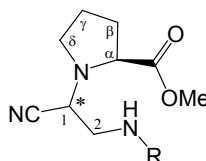
H-Gly Ψ [(R)CH(CN)N]Pro-OMe·HCl [(R)-182]:

Se obtiene al tratar (**R**)-**181** con una disolución de HCl en AcOEt 3.2M según el procedimiento general descrito. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos se recogen en la Tabla 5.16.

H-GlyΨ[(S)CH(CN)N]Pro-OMe·HCl [(S)-182]:

Se sintetiza por tratamiento del dipéptido (**(S)**-**181** con una disolución de HCl en AcOEt 3.2M según el procedimiento general descrito. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos se recogen en la Tabla 5.16.

Tabla 5.16. Datos analíticos y espectroscópicos más característicos de los pseudodipéptidos GlyΨ[CH(CN)N]Pro (**(R)**-, (**(S)**-**181** y (**(R)**-, (**(S)**-**182**.



	(R) - 181	(S) - 181	(R) - 182	(S) - 182
R	Boc	Boc	H	H
Rdto. (%)	36	17	99	99
P.f. (°C)	Aceite	Aceite	Sirupe	Sirupe
$[\alpha]_D^{20}$	-77.0 (c 1, CHCl ₃)	-8.4 (c 1, CHCl ₃)	-66.1 (c 1, CHCl ₃)	-37.4 (c 1, MeOH)
EM-ES (m/z)	298 [M ⁺ +1]	298 [M ⁺ +1]	198 [M ⁺ +1]	198 [M ⁺ +1]
¹H-RMN^{a, b}				
H _α	3.44 (dd, 8.9, 6.5)	3.58 (dd, 9.8, 3.4)	3.46 (dd, 9.3, 6.2)	3.60 (dd, 9.7, 3.5)
H _β	2.15 y 2.02 (m)	2.20 y 2.06 (m)	1.99 y 1.74 (m)	2.12-1.84 (m)
H _γ	1.94-1.85 (m)	1.93-1.84 (m)	1.81-1.49 (m)	1.71 y 1.58 (m)
H _δ	3.09 (m) y 2.66 (q, 8.2)	3.19 (m) y 2.81 (q, 8.6)	2.91 y 2.45 (m)	3.00 y 2.67 (m)
H ₁	4.12 (dd, 9.3, 6.4)	3.96 (dd, 9.3, 4.9)	4.23 (dd, 10.1, 5.7)	4.28 (dd, 11.4, 4.9)
H ₂	3.55 (m) y 3.31 (ddd, -13.4, 9.3, 4.2)	3.66 y 2.96 (m)	3.18 y 2.91 (m)	3.24 (dd, -13.6, 4.9) y 3.03 (dd, -13.6, 11.6)
NH	5.13 (m)	5.52 (m)	---	---
¹³C-RMN^a				
CO	173.0	175.4	175.8	177.3
C _α	63.5	60.5	63.3	61.5
C _β	28.7	30.6	28.9	30.1
C _γ	23.3	24.1	23.2	23.8
C _δ	47.8	54.4	52.5	53.1
C ₁	54.1	55.8	51.5	52.3
C ₂	41.5	41.9	39.1	39.4
CN	116.0	116.4	115.2	115.6

a) Los espectros de **181** y **182** fueron realizados a 300 MHz para ¹H-RMN y 75 MHz para ¹³C-RMN en muestras disueltas en CDCl₃ y en D₂O respectivamente. Valores de desplazamiento químico en ppm. b) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz).

Síntesis de Boc-ProΨ[CH(CN)NH]Gly-OMe [(R,S)-190]:

Se obtiene según el procedimiento general descrito anteriormente de la reacción de Strecker modificada, haciendo reaccionar H-Gly-OMe·HCl y el α-aminoaldehído Boc-Pro-H (**138**). El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna en AcOEt/Hexano (1:2) obteniéndose la mezcla de los dos diastereoisómeros como un aceite incoloro (68%) en una proporción 70:30 medida en el espectro de ^1H -RMN del bruto de reacción. Los intentos de separación cromatográfica de los mismos fueron infructuosos. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.37 (m, 1H, CHCN), 4.18-3.95 (m, 2H, Pro- H_α), 3.75 (s, 3H, OMe-May), 3.73 (s, 3H, OMe-min), 3.64-3.43 (m, 6H, 4Gly- H_α , 2Pro- H_δ), 3.42-3.35 (m, 2H, Pro- H_δ), 2.16 (m, 2H, Pro- H_β), 2.07 (m, 2H, Pro- H_γ), 2.03-1.89 (m, 4H, 2Pro- H_β , 2Gly-NH), 1.83 (m, 2H, Pro- H_γ), 1.50-1.43 (s, 18H, ^tBu); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.3 (Gly-CO), 154.9 (Boc-CO), 118.6 (CN-min), 118.2 (CN-May), 80.1 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$), 59.2 (Pro- C_α -min), 58.8 (Pro- C_α -May), 53.7 (CHCN -min), 53.1 (CHCN -May), 52.0 (OMe-May), 51.9 (OMe-min), 48.9 (Gly- C_α), 47.1 (Pro- C_δ), 29.0 (Pro- C_β), 28.3 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$ -May), 28.2 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$ -min), 23.2 (Pro- C_γ); **EM-ES** (m/z): 320 (84) [$\text{M}^+ + \text{Na}$], 298 (100) [$\text{M}^+ + 1$].

H-ProΨ[CH(CN)NH]Gly-OMe·HCl [(R,S)-191]:

Se obtiene al tratar la mezcla de pseudodipéptidos (**R,S**)-**190** con disolución de HCl burbujeado en AcOEt 3.2M de acuerdo con el procedimiento general descrito, como una espuma (99%), en una proporción similar a la observada para la mezcla (**R,S**)-**190**. ^1H -RMN (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 4.04 (d, 1H, $J = 5.7$, CHCN -min), 3.87 (d, 1H, $J = 1.4$, CHCN -May), 3.84-3.69 (m, 2H, Pro- H_α), 3.52 (s, 6H, OMe), 3.50-3.38 (m, 4H, Gly- H_α), 3.22-3.13 (m, 4H, Pro- H_δ), 2.11 (m, 2H, Pro- H_β), 1.97-1.81 (m, 4H, Pro- H_γ), 1.74 (m, 2H, Pro- H_β); ^{13}C -RMN (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 173.6 (Gly-CO), 117.3 (CN), 60.0 (Pro- C_α -May), 59.7 (Pro- C_α -min), 52.0 (OMe), 50.9 (CHCN -May), 49.4 (CHCN -min), 47.6 (Gly- C_α), 46.9 (Pro- C_δ -min), 45.7 (Pro- C_δ -May), 27.2 (Pro- C_β), 23.2 (Pro- C_γ); **EM-ES** (m/z): 198 (100) [$\text{M}^+ + 1$].

5.2.7. SÍNTESIS DE OXOPIPERAZINAS Y DERIVADOS BICÍCLICOS

5.2.7.1. 2-Oxopiperazinas, 1,6-Dioxoperhidropirrolol[1,2-*a*]pirazinas y 3,7-Dioxoperhidropirazino[1,2-*a*]pirazinas

Lactamización de la mezcla de pseudopéptidos Boc-GlyΨ[CH(CH₂NH₂)NH]Glu(O^tBu)-OMe [(R,S)-155]. Síntesis de las 2-oxopiperazinas (R)- y (S)-156:

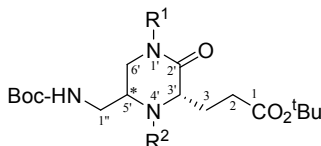
Se disuelven 140 mg (0.36 mmol) de la mezcla epimérica (R,S)-155 en 8 mL de tolueno y se calienta a reflujo durante 22 horas. Transcurrido este tiempo se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna en Acetona/AcOEt (2:1) obteniéndose las 2-oxopiperazinas (S)-156 (50%, R_f = 0.38) y (R)-156 (43%, R_f = 0.20). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en las Tablas 5.17 y 5.18.

Procedimiento general para la N-carboxialquilación en posición 1' de las 2-oxopiperazinas (R)- y (S)-156. Síntesis de las 2-oxopiperazinas (R)- y (S)-158:

Sobre una disolución de la 2-oxopiperazina (R)- o (S)-156 (0.14 mmol), en THF anhidro (5 mL), enfriada a 0 °C, se añade NaH en forma de suspensión al 60% en aceite mineral (0.17 mmol) y se agita durante 15 minutos a la misma temperatura en atmósfera de Árgon. A continuación se añade bromoacetato de *terc*-butilo (0.17 mmol) y se deja reaccionar alcanzando temperatura ambiente durante un intervalo de 2 a 3 horas hasta la completa consumición del producto de partida. Se evapora el disolvente a sequedad y el residuo resultante se disuelve en CH₂Cl₂ (10 mL) y se lava con HCl 1N (10 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica en AcOEt/Hexano (5:1) aislándose el derivado de

Procedimiento general para la N-carboxialquilación en posición 4' de las 2-oxopiperazinas (R)- y (S)-156. Síntesis de las 2-oxopiperazinas (R)- y (S)-160:

Tabla 5.17. Datos analíticos más característicos de las 2-oxopiperazinas **156**, **158** y **160**.



Compuesto	R ¹ , R ²	Rdto. (%)	P.f. (°C)	$[\alpha]^{20}_D$	EM-ES (m/z)
(R)-156	H, H	43	108-111 ^a	-12.8 (c 1, CHCl ₃)	358 [M ⁺ +1]
(S)-156	H, H	50	Aceite	-23.1 (c 1, CHCl ₃)	358 [M ⁺ +1]
(R)-158	CO ₂ ^t Bu, H	71	Aceite	-27.5 (c 1.1, CHCl ₃)	472 [M ⁺ +1]
(S)-158	CO ₂ ^t Bu, H	96	Sirupe	-10.3 (c 0.7, CHCl ₃)	472 [M ⁺ +1]
(R)-160	H, CO ₂ ^t Bu	64	Aceite	-15.4 (c 0.5, CHCl ₃)	472 [M ⁺ +1]
(S)-160	H, CO ₂ ^t Bu	69	Espuma	-9.2 (c 1, CHCl ₃)	472 [M ⁺ +1]

a) Recristalizado en Et₂O/Hexano.

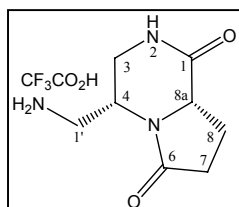
*** Cabe destacar que en los compuestos (**R**)- y (**S**)-**158** resultantes de la *N*-carboxialquilación en posición 1' de (**S**)- y (**R**)-**156**, el orden de prelación de los sustituyentes sobre el centro estereogénico del enlace pseudopeptídico cambia respecto a su correspondiente antecesor, de forma que los epímeros (*R*), dan lugar a epímeros de configuración (*S*), y viceversa.

TABLA 5.18

Eliminación de los grupos protectores Boc y ^tBu de las 2-oxopiperazinas (R)-, (S)-156, (R)-, (S)-158 y (R)-, (S)-160.

A la correspondiente 2-oxopiperazina protegida **156**, **158** ó **160** (0.10 mmol), disuelta en 4 mL de CH₂Cl₂, se le añaden 570 µL de TFA y se deja reaccionar a t.a. durante el tiempo indicado en cada caso. Transcurrido este tiempo el disolvente se evapora a sequedad añadiendo más CH₂Cl₂ (3 x 2 mL) para eliminar las trazas de TFA y se liofiliza. De esta manera, a partir de (R)-, (S)-**156** y (R)-, (S)-**158** se obtienen los correspondientes derivados de pirrolopirazinas (R)-, (S)-**157** y (R)-, (S)-**159**, no siendo necesaria una purificación adicional; mientras que las 2-oxopiperazinas (R)-, (S)-**160** conducen a una mezcla de las 2-oxopiperazinas 3',4',5'-trisustituidas desprotegidas (R)- y (S)-**161**, y sus correspondientes derivados de pirazinopirazinas (R)- y (S)-**162**. Esta mezcla se separa, en cada caso, mediante cromatografía en fase reversa utilizando un gradiente de 0-10% de CH₃CN en H₂O. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de todos estos derivados se recogen a continuación:

(4R,8aS)-4-(Aminometil)-1,6-dioxoperhidropirrolo[1,2-a]pirazina [(R)-157]: Se

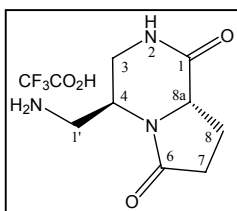


obtiene a partir de la 2-oxopiperazina (S)-**156** por tratamiento con TFA durante 20 h, siguiendo el método descrito anteriormente, para dar el derivado de pirrolopirazina (R)-**157** como un sólido céreo (99%). $[\alpha]^{20}_D = -15.3$ (c 1, MeOH); ¹H-RMN (300 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 7.90 (m, 1H, NH), 4.21 (dd, 1H, J = 9.9 y 7.3,

H_{8a}), 4.05 (m, 1H, H₄), 3.49 y 3.30 (sist. ABX, 2H, J = -14.4, 4.4 y 1.9, H₃), 3.25-2.99 (m, 2H, H_{1'}), 2.51-2.17 (m, 2H, H₇), 2.10 (m, 1H, H₈), 1.90 (m, 1H, H₈); ¹³C-RMN (75 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 178.4 (C₆), 173.8 (C₁), 57.9 (C_{8a}), 49.2 (C₄), 41.4 (C₃), 39.1 (C_{1'}), 31.0 (C₇), 21.1 (C₈); **EM-ES** (m/z): 206 (46) [M⁺+Na], 184 (100) [M⁺+1].

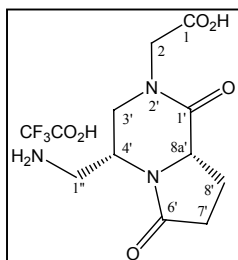
(4S,8aS)-4-(Aminometil)-1,6-dioxoperhidropirrolo[1,2-a]pirazina [(S)-157]: Se

obtiene por tratamiento con TFA de la 2-oxopiperazina (R)-**156** durante 20 h, según el procedimiento descrito anteriormente, para dar el derivado de pirrolopirazina (S)-**157** como un sólido blanco (93%). **P.f.** 118-121 °C (MeOH/Et₂O); $[\alpha]^{20}_D = -30.9$ (c 1,



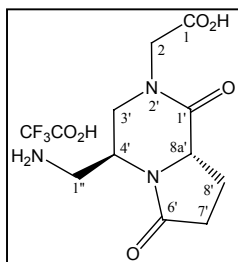
MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) δ (ppm): 7.78 (m, 1H, NH), 4.30-4.15 (m, 2H, H_{8a} , H_4), 3.40 (dd, 1H, $J = -13.7$ y 5.8 , H_3), 3.11-2.98 (m, 3H, $2\text{H}_{1'}$, H_3), 2.38 (m, 1H, H_7), 2.25-2.08 (m, 2H, H_8 , H_7), 1.98 (m, 1H, H_8); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) δ (ppm): 178.6 (C_6), 172.4 (C_1), 54.8 (C_{8a}), 45.5 (C_4), 41.4 (C_3), 39.2 ($\text{C}_{1'}$), 30.2 (C_7), 20.9 (C_8); **EM-ES** (m/z): 206 (7) [$\text{M}^+ + \text{Na}$], 184 (100) [$\text{M}^+ + 1$].

Ácido 2-[(4'R, 8a'S)-4'-(aminometil)-1',6'-dioxoperhidropirrololo[1,2-a]pirazin-2'-il]acético [(R)-159]:



Se obtiene a partir de la 2-oxopiperazina (**R**)-**158** por tratamiento con TFA durante 20 h siguiendo el protocolo descrito anteriormente, para dar el derivado de pirrolopirazina (**R**)-**159** como un sólido amorfo (97%). $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -9.1$ (c 0.6, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 4.30 (dd, 1H, $J = 10.0$ y 7.1 , $\text{H}_{8a'}$), 4.14 y 3.98 (sist. AB, 2H, $J = -18.0$, H_2), 4.10 (m, 1H, H_4), 3.81 (dd, 1H, $J = -14.2$ y 4.5 , H_3), 3.44 (dd, 1H, $J = -14.2$ y 2.7 , H_3), 3.28 y 3.20 (sist. ABX, 2H, $J = -13.6$, 7.3 y 4.8 , $\text{H}_{1''}$), 2.46-2.22 (m, 2H, H_7), 2.15 (m, 1H, H_8), 1.96 (m, 1H, H_8); $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, D_2O) δ (ppm): 178.6 (C_6), 172.7 (C_1), 172.5 ($\text{C}_{1'}$), 58.5 ($\text{C}_{8a'}$), 49.5 (C_3), 49.4 (C_4), 49.0 (C_2), 41.6 ($\text{C}_{1''}$), 31.4 (C_7), 21.7 (C_8); **EM-ES** (m/z): 242 (100) [$\text{M}^+ + 1$].

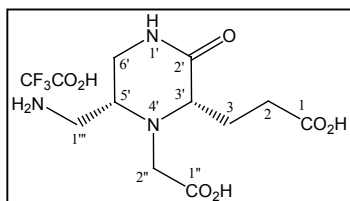
Ácido 2-[(4'S, 8a'S)-4'-(aminometil)-1',6'-dioxoperhidropirrololo[1,2-a]pirazin-2'-il]acético [(S)-159]:



Se obtiene por tratamiento con TFA de la 2-oxopiperazina (**S**)-**158** durante 20 h según el método descrito anteriormente, para dar el derivado de pirrolopirazina (**S**)-**159** como una espuma (99%). $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -28.8$ (c 0.4, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 4.40-4.30 (m, 2H, $\text{H}_{8a'}$, H_4), 4.07 y 3.96 (sist. AB, 2H, $J = -17.9$, H_2), 3.64 (dd, 1H, $J = -13.6$ y 5.7 , H_3), 3.33 (dd, 1H, $J = -13.6$ y 4.8 , H_3), 3.24 (dd, 1H, $J = -13.6$ y 10.5 , $\text{H}_{1''}$), 3.11 (dd, 1H, $J = -13.6$ y 3.9 , $\text{H}_{1''}$), 2.41 (m, 1H, H_7), 2.34-2.23 (m, 2H, H_7 , H_8), 2.07 (m, 1H, H_8); ^{13}C -

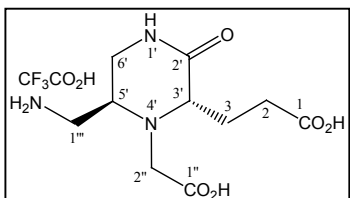
RMN (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 178.6 (C_{6'}), 172.2 (C₁), 171.1 (C_{1'}), 55.2 (C_{8a'}), 48.8 (C_{3'}), 48.7 (C_{2'}), 46.0 (C_{4'}), 39.3 (C_{1''}), 30.2 (C_{7'}), 21.2 (C_{8'}); **EM-ES** (m/z): 242 (100) [M⁺+1].

Ácido 3-[(3'S, 5'R)-5'-(aminometil)-4'-(carboximetil)-2'-oxopiperazin-3'-il]-propanoico ^{†††} [(**R**)-**161**]: Se obtiene a partir la 2-oxopiperazina (**S**)-**160** por tratamiento con TFA durante 16 h siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, para dar el derivado de 2-oxopiperazina (**R**)-**161** como un sólido blanco (44%). **P.f.** 159-162 °C (MeOH/Et₂O); **¹H-**



RMN (400 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 7.76 (s, 1H, H_{1'}), 3.50 (d, 1H, $J = -17.2$, H_{2''}), 3.44-3.28 (m, 2H, H₅, H_{1'''}), 3.27-3.03 (m, 3H, H_{3'}, H_{1'''}, H_{6'}), 2.93 (m, 1H, H_{6'}), 2.89 (d, 1H, $J = -17.2$, H_{2''}), 2.35-2.19 (m, 2H, H₂), 1.96-1.71 (m, 2H, H₃); **¹³C-RMN** (100 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 178.3 (C₁), 175.7 (C_{2'}), 174.3 (C_{1''}), 62.4 (C_{3'}), 54.3 (C_{5'}), 53.4 (C_{2''}), 42.2 (C_{1'''}), 39.9 (C_{6'}), 30.1 (C₂), 24.7 (C₃); **EM-ES** (m/z): 260 (100) [M⁺+1].

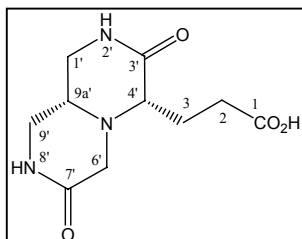
Ácido 3-[(3'S, 5'S)-5'-(aminometil)-4'-(carboximetil)-2'-oxopiperazin-3'-il]-propanoico ^{†††} [(**S**)-**161**]: Se obtiene por tratamiento con TFA durante 16 h de la 2-oxopiperazina (**R**)-**160** según el método descrito anteriormente, para obtener el derivado de 2-oxopiperazina (**S**)-**161** como un sólido blanco (56%). **P.f.** 120-123 °C (MeOH/Et₂O); **¹H-RMN** (400



MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 7.66 (s, 1H, H_{1'}), 3.43 (d, 1H, $J = -17.9$, H_{2''}), 3.32 (m, 1H, H_{5'}), 3.24 (dd, 1H, $J = -13.3$ y 5.5, H_{1'''}), 3.19 (dd, 1H, $J = 9.5$ y 5.6, H_{3'}), 3.05 (d, 1H, $J = -17.9$, H_{2''}), 3.03 (dd, 1H, $J = -13.3$ y 2.9, H_{1'''}), 2.96-2.82 (m, 2H, H_{6'}), 2.46-2.28 (m, 2H, H₂), 1.89-1.79 (m, 2H, H₃); **¹³C-RMN** (100 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 178.1 (C₁), 176.0 (C_{2'}), 174.4 (C_{1''}), 61.9 (C_{3'}), 50.6 (C_{5'}), 49.9 (C_{2''}), 39.5 (C_{1'''}), 38.1 (C_{6'}), 30.7 (C₂), 23.7 (C₃); **EM-ES** (m/z): 260 (100) [M⁺+1].

^{†††} Para facilitar el seguimiento de la memoria, al nombrar los compuestos (**R**)- y (**S**)-**161** se ha mantenido la numeración original del esqueleto de 2-oxopiperazina, a pesar de que en la nomenclatura IUPAC de (**R**)- y (**S**)-**161** la posición 1' del anillo de oxopiperazina corresponde a la asignada como 4'.

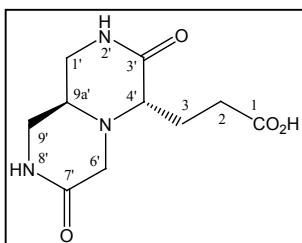
Ácido 3-[(4'S, 9a'R)-3',7'-dioxoperhidropirazino[1,2-a]pirazin-4'-il]propanoico [(R)-162]: Se obtiene a partir de la 2-oxopiperazina (**S**)-**160** por tratamiento con TFA



durante 16 h siguiendo el protocolo descrito con anterioridad, para obtener el derivado de pirazinopirazina (**R**)-**162** como un sólido blanco (28%).

P.f. 213-215 °C (MeOH/Et₂O); $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +62.4$ (c 0.6, H₂O); **¹H-RMN** (400 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 7.96 (s, 1H, H_{8'}), 7.78 (s, 1H, H₂), 3.49 (d, 1H, $J = -17.1$, H_{6'}), 3.26-3.18 (m, 2H, H₁, H_{9'}), 3.05 (dd, 1H, $J = 4.7$ y 3.8, H_{4'}), 3.03-2.89 (m, 3H, H_{1'}, H_{9'}, H_{9a'}), 2.87 (d, 1H, $J = -17.1$, H_{6'}), 2.27-2.11 (m, 2H, H₂), 2.05 (m, 1H, H_{10'}), 1.93 (m, 1H, H₃); **¹³C-RMN** (100 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 178.4 (C₁), 172.4 (C_{3'}), 170.8 (C_{7'}), 63.9 (C_{4'}), 53.5 (C_{6'}), 49.6 (C_{9a'}), 43.1 (C_{9'}), 42.3 (C_{1'}), 30.1 (C₂), 24.8 (C₃); **EM-ES** (m/z): 264 (25) [M⁺+Na], 242 (100) [M⁺+1].

Ácido 3-[(4'S, 9a'S)-3',7'-dioxoperhidropirazino[1,2-a]pirazin-4'-il]propanoico [(S)-162]: Se obtiene por tratamiento con TFA de la 2-oxopiperazina (**R**)-**160** según el



método descrito anteriormente durante 16 h, para dar el derivado de pirazinopirazina (**S**)-**162** como un sólido céreo (43%).

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +28.6$ (c 1.1, MeOH); **¹H-RMN** (400 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 7.71-7.67 (m, 2H, H_{2'}, H_{8'}), 3.50 (m, 1H, H_{9a'}), 3.43-3.30 (m, 2H, H_{1'}, H_{9'}), 3.31 y 3.24 (sist. AB, 2H, $J = -18.4$, H_{6'}), 3.22-3.08 (m, 2H, H_{1'}, H_{9'}), 3.04 (dd, 1H, $J = 8.1$ y 5.9, H_{4'}), 2.38-2.20 (m, 2H, H₂), 2.02-1.83 (m, 2H, H₃); **¹³C-RMN** (100 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 178.4 (C₁), 173.2 (C_{3'}), 170.7 (C_{7'}), 61.7 (C_{4'}), 50.4 (C_{6'}), 43.4 (C_{9a'}), 40.7 (C_{9'}), 38.6 (C_{1'}), 31.4 (C₂), 25.5 (C₃); **EM-ES** (m/z): 264 (21) [M⁺+Na], 242 (100) [M⁺+1].

5.2.7.2. Dipéptidos y pseudodipéptidos cíclicos

1,4-Dioxoperhidropirrol[1,2-a]pirazinas, 5,8-dioxoperhidrotiazolo[3,4-a]pirazina y 1,4-dioxoperhidropirido[1,2-a]pirazinas

Acoplamiento de Boc-Gly-OH a H-P^{Me}-OMe y H-dmP-OMe (163 y 164):

A una disolución del correspondiente derivado de prolina H-P^{Me}-OMe·HCl (**163**) o H-dmP-OMe·HCl (**164**) (0.30 mmol) en 3 mL de CH₂Cl₂, se añade sucesivamente Boc-Gly-OH (0.36 mmol), HATU (0.36 mmol) y Et₃N (0.96 mmol) y se deja la mezcla reaccionar durante 16 horas. Pasado este tiempo, se trata la reacción según el protocolo general para reacciones de acoplamiento en disolución descrito anteriormente. Finalmente, el residuo resultante se purifica mediante cromatografía radial en el eluyente indicado en cada caso para obtener el correspondiente dipéptido protegido **165** ó **166**. Los datos analíticos y espectroscópicos de estos compuestos se recogen a continuación:

Boc-Gly-P^{Me}-OMe (165): Se obtiene por acoplamiento entre Boc-Gly-OH y H-P^{Me}-OMe·HCl (**163**) y posterior purificación del bruto de reacción mediante cromatografía radial en AcOEt/Hexano (10:1) como un aceite incoloro (97%). $[\alpha]_D^{20} = -59.0$ (c 1, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.42 (m, 1H, Gly-NH), 3.92-3.83 (m, 2H, Gly-H_α), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.60-3.43 (m, 2H, P^{Me}-H_δ), 2.21-1.82 (m, 4H, 2P^{Me}-H_β, 2P^{Me}-H_γ), 1.55 (s, 3H, CH₃), 1.41 (s, 9H, ^tBu); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.9 (P^{Me}-CO), 166.4 (Gly-CO), 155.6 (Boc-CO), 79.3 (C-(CH₃)₃), 66.1 (P^{Me}-C_α), 52.3 (OMe), 46.7 (P^{Me}-C_δ), 43.1 (Gly-C_α), 38.2 (P^{Me}-C_β), 28.2 (C-(CH₃)₃), 23.8 (P^{Me}-C_γ), 21.3 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 323 (100) [M⁺+Na], 301 (7) [M⁺+1].

Boc-Gly-dmP-OMe (166): Se obtiene por acoplamiento entre Boc-Gly-OH y H-dmP-OMe·HCl (**164**) y posterior purificación del bruto de reacción mediante

cromatografía radial en AcOEt/Hexano (1:1) como un aceite incoloro (70%). $[\alpha]^{20}_D = -47.8$ (c 1, CHCl₃); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.45 (m, 1H, Gly-NH), 4.35 (d, 1H, $J = 8.3$, dmP-H _{α}), 3.86 (dd, 1H, $J = -16.7$ y 5.0, Gly-H _{α}), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.49 (dd, 1H, $J = -16.7$ y 3.5, Gly-H _{α}), 2.20 (m, 1H, dmP-H _{β}), 2.05 (m, 1H, dmP-H _{β}), 1.91-1.71 (m, 2H, dmP-H _{γ}), 1.59 (s, 3H, CH₃), 1.41 (s, 9H, ^tBu), 1.37 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.1 (dmP-CO), 166.8 (Gly-CO), 155.7 (Boc-CO), 79.4 (C-(CH₃)₃), 64.1 (dmP-C _{δ}), 60.4 (dmP-C _{α}), 52.7 (OMe), 43.4 (Gly-C _{α}), 39.2 (dmP-C _{γ}), 28.3 (C-(CH₃)₃), 28.0 (dmP-C _{β}), 26.4 (CH₃), 24.8 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 337 (100) [M⁺+Na].

H-Gly-P^{Me}-OMe·HCl (167):

Se obtiene por tratamiento del dipéptido *N*-Boc protegido **165** con disolución de HCl en AcOEt 3.2M durante 5 horas, según el procedimiento descrito con anterioridad, como un sólido blanco (96%). **P.f.** 155-158 °C (Et₂O/Hexano); $[\alpha]^{20}_D = -27.4$ (c 0.5, CHCl₃); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 3.67 (s, 2H, Gly-H _{α}), 3.56 (s, 3H, OMe), 3.54-3.40 (m, 2H, P^{Me}-H _{δ}), 2.01 (m, 1H, P^{Me}-H _{β}), 1.98-1.80 (m, 3H, P^{Me}-H _{β} , 2P^{Me}-H _{γ}), 1.34 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, D₂O) δ (ppm): 175.9 (P^{Me}-CO), 164.1 (Gly-CO), 66.6 (P^{Me}-C _{α}), 52.8 (OMe), 47.1 (P^{Me}-C _{δ}), 40.2 (Gly-C _{α}), 37.7 (P^{Me}-C _{β}), 23.1 (P^{Me}-C _{γ}), 19.8 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 201 (100) [M⁺+1].

H-Gly-dmP-OMe·HCl (168):

Se obtiene por tratamiento del dipéptido *N*-Boc protegido **166** con HCl en AcOEt 3.2M durante 3 horas, según el procedimiento antes descrito, como una espuma (72%). $[\alpha]^{20}_D = -59.7$ (c 0.7, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 4.48 (d, 1H, $J = 8.5$, dmP-H _{α}), 3.72 y 3.41 (sist. AB, 2H, $J = -16.1$, Gly-H _{α}), 3.62 (s, 3H, OMe), 2.14 (m, 1H, dmP-H _{β}), 2.02 (m, 1H, dmP-H _{β}), 1.74-1.53 (m, 2H, dmP-H _{γ}), 1.34 (s, 3H, CH₃), 1.19 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C-RMN}$ (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 174.0 (dmP-CO), 165.1 (Gly-CO), 65.2 (dmP-C _{δ}), 61.3 (dmP-C _{α}), 53.5 (OMe), 41.0 (Gly-C _{α}), 38.9 (dmP-C _{γ}), 27.5 (dmP-C _{β}), 25.9 (CH₃), 23.8 (CH₃); **EM-ES** (m/z): 215 (100) [M⁺+1].

Boc-Thz-Gly-OMe (171):

Se obtiene por reacción de acoplamiento en disolución entre Boc-Thz-OH y H-Gly-OMe siguiendo el protocolo general descrito en el Apartado 5.2.4.2. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía radial en AcOEt/Hexano (1:1) para obtener el derivado de pseudoprolina **171** como un aceite (98%). $[\alpha]^{20}_D = -116.4$ (c 1, CHCl₃), $[\alpha]^{20}_D$ lit.¹⁴³ = -120.8 (c 1.3, CHCl₃); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.73 (m, 1H, Gly-NH), 4.66 y 4.36 (sist. AB, 2H, *J* = -9.4, Thz-H_δ), 4.18-4.01 (m, 3H, Thz-H_α, 2Gly-H_α), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.40 (m, 1H, Thz-H_β), 3.20 (m, 1H, Thz-H_β) 1.48 (s, 9H, ^tBu).

H-Thz-Gly-OMe-HCl (172):

Se obtiene por tratamiento del dipéptido **171** con HCl en AcOEt 3.2M durante 1 hora, según el procedimiento general descrito, como una espuma (99%) tras liofilizar. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.56 (m, 1H, Gly-NH), 4.23 y 4.00 (sist. AB, 2H, *J* = -9.9, Thz-H_δ), 4.18 (dd, 1H, *J* = 7.8 y 4.1, Thz-H_α), 4.10-3.92 (m, 2H, Gly-H_α), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.42 (dd, 1H, *J* = -10.8 y 4.1, Thz-H_β), 3.07 (dd, 1H, *J* = -10.8 y 7.8, Thz-H_β), 2.47 (m, 1H, NH-Thz); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.2 (Thz-CO), 170.1 (Gly-CO), 65.7 (Thz-C_α), 53.4 (OMe), 52.3 (Thz-C_δ), 40.9 (Gly-C_α), 35.0 (Thz-C_β); **EM-ES** (m/z): 205 (100) [M⁺+1].

H-Pip-Gly-OH·CF₃CO₂H (176):

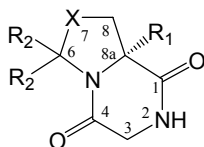
Mediante los procedimientos generales descritos anteriormente en el Apartado 5.2.4.1 de acoplamiento y eliminación del grupo protector Fmoc en fase sólida, se sintetiza el dipéptido anclado a la resina **175**, tal y como se indica en el Esquema 3.25 del Capítulo 3.5.1. En este caso, como soporte polimérico se utiliza la resina tipo Wang Fmoc-Gly-*p*-alcoxibencilo de poliestireno. Posteriormente, se desancla **175** de la resina por tratamiento con 1.5 mL de una mezcla de TFA/H₂O (19:1) a t.a. durante 2 h. Pasado este tiempo se lava la resina con CH₂Cl₂ (3 x 3 mL) recogiendo los extractos orgánicos en un matraz. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se liofiliza para dar el dipéptido desprotegido **176** como un sólido amorfo (99%). ¹H-RMN (300 MHz, H₂O/D₂O) δ (ppm): 7.08 (m, 1H, Gly-NH), 3.96 (m 2H, Gly-H_α), 3.72 (d, 1H,

$J = 8.5$, Pip- H_α), 2.73-2.59 (m, 2H, Pip- H_ϵ), 2.27 (m, 1H, Pip- H_β), 1.91 (m, 1H, Pip- H_γ), 1.84-1.41 (m, 4H, Pip- H_β , Pip- H_γ , 2Pip- H_δ). **EM-ES** (m/z): 187 (100) [$M^+ + 1$].

Procedimiento general de lactamización para la formación de las 2,5-dicetopiperazinas derivadas de P^{Me} , dmP, Thz y Pip (169, 170, 173 y 177):

Se disuelven 0.25 mmol del dipéptido correspondiente *N*-desprotegido [H-Gly- P^{Me} -OMe (**167**), H-Gly-dmP-OMe (**168**), H-Gly-Thz-OMe (**172**) o H-Gly-Pip-OH (**176**)] en 5 mL de una disolución de AcOH en *i*-BuOH 0.1M y se calienta a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. Seguidamente, se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna en el eluyente señalado en cada caso y liofiliza para obtener los correspondientes derivados de 2,5-dicetopiperazinas de P^{Me} , dmP, Thz o Pip (**169**, **170**, **173** ó **177** respectivamente). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en la Tabla 5.19, excepto los de **177** que se detallan a continuación:

Ciclo(Pip-Gly) (**177**): Se obtiene a partir de **176** tras 24 horas de reacción como un sólido blanco sin necesidad de purificación adicional (87%). **P.f.** 158-161 °C (MeOH/Et₂O), **P.f.** lit.¹⁴⁵ 159-160 °C; **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.77 (m, 1H, Gly-NH), 4.67 (d, 1H, $J = -13.0$, Pip- H_ϵ), 4.03 (s, 2H, Gly- H_α), 3.84 (d, 1H, $J = 9.3$, Pip- H_α), 2.52 (dt, 1H, $J = -13.0$ y 2.8, Pip- H_ϵ), 2.34 (m, 1H, Pip- H_β), 2.00 (m, 1H, Pip- H_γ), 1.73 (m, 1H, Pip- H_δ), 1.66-1.38 (m, 3H, Pip- H_β , Pip- H_γ , Pip- H_δ). **EM-ES** (m/z): 169 (100) [$M^+ + 1$].

Tabla 5.19. Datos analíticos y espectroscópicos de **169**, **170** y **173**.

	169	170	173 ^{†††, 96}
R ₁	Me	H	H
R ₂	H	Me	H
X	CH ₂	CH ₂	S
t ^a	48	24	55
Eluyente	DCM/MeOH (10:1)	DCM/MeOH (10:1)	DCM/MeOH (20:1)
Rdto. (%)	95	99	59
P.f. (°C) ^b	128-131 ^c	163-166	175-177
[α] _D ²⁰	-141.5 (c 1, MeOH) ^c	-102.3 (c 0.4, MeOH)	-131.5 (c 1, MeOH)
EM-ES (m/z)	169 [M ⁺ +1]	183 [M ⁺ +1]	173 [M ⁺ +1]
¹ H-RMN ^{d, e}			
H ₂	7.35 (m)	6.92 (m)	6.58 (m)
H ₃	4.02 y 3.68 (AB, -17.8)	3.87 y 3.53 (AB, -17.1)	4.16 (d, -17.3) y 3.99 (dd, -17.3, 3.7)
H ₆	3.46-3.35 (m)	1.30 y 1.17 (s) ^g	4.91 y 4.47 (AB, -9.8)
H ₇	2.02-1.76 (m)	1.80-1.64 (m)	---
H ₈	2.02-1.76 (m)	1.98 y 1.79 (m)	3.43 (dd, -11.5, 6.4) y 3.25 (dd, -11.5, 9.5)
H _{8a}	1.23 (s) ^f	4.23 (m)	4.36 (dd, 8.7, 7.2)
¹³ C-RMN ^d			
C ₁	174.9	172.3	167.0
C ₃	45.1	46.1	46.4
C ₄	165.8	166.0	162.5
C ₆	45.1	63.9	48.2
C ₇	34.4	38.7	---
C ₈	19.8	25.1	33.4
C _{8a}	64.8	59.7	60.7

a) Tiempos de reacción en horas. b) Compuestos recristalizados en MeOH/Et₂O. c) P. f. lit. ¹⁵⁷ = 133-135 °C; [α]_D lit. ¹⁵⁷ = -128.1 (c 0.5, MeOH). d) Los espectros de **169**, **170** y **173** fueron realizados a 300 MHz para ¹H-RMN y 75 MHz para ¹³C-RMN en muestras disueltas en H₂O/D₂O, excepto **173** que fue disuelto en CDCl₃. Valores de desplazamiento químico en ppm. e) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). f) Desplazamiento químico para el Me en posición 8a. g) Desplazamiento químico para los Me en posición 6.

^{†††} Para facilitar el seguimiento de la Tabla 5.21, al numerar el compuesto 5,8-dioxoperhidrotiazolo[3,4-α]pirazina (**173**), se ha seguido el mismo criterio que para el esqueleto de pirrolo[1,2-α]pirazina de **169** y **170**, a pesar de que en la nomenclatura IUPAC a la posición 1 de **173** le corresponde la adjudicada como 8.

*1-Oxoperhidropirrollo[1,2-a]pirazinas***Reacción de lactamización de H-GlyΨ[CH₂N]Pro-OMe·HCl (179). Síntesis de ciclo(GlyΨ[CH₂N]Pro) (180):**

Se disuelven 121 mg (0.59 mmol) del pseudodipéptido **179** en 5 mL de AcOH/i-BuOH 0.1M y se lleva a reflujo durante 24 horas, hasta observar la completa desaparición del producto de partida. Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente a vacío y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía en fase reversa utilizando un gradiente de 0-10% de CH₃CN en H₂O para dar el derivado de 1-oxopirrolopirazina **180** como un sólido blanco (76%). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos se encuentran recogidos en la Tabla 5.20.

Reacción de lactamización de H-GlyΨ(S)CH(CN)N]Pro-OMe·HCl [(S)-182]. Síntesis de ciclo(GlyΨ[CH(CN)N]Pro) [(R)- y (S)-183]:

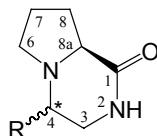
A una disolución del pseudodipéptido (S)-**182** (231 mg, 0.74 mmol) en 5 mL de una mezcla DCM/MeOH (4:1) se añaden 104 μL (0.70 mmol) de Et₃N y se deja reaccionar a 40 °C. Tras 5 días de reacción se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna en AcOEt/Acetona (1:1) como eluyente, obteniéndose los diastereoisómeros derivados de 1-oxopirrolopirazinas (R)-**183** (25 mg, 20%, R_f = 0.36) y (S)-**183** (8 mg, 8%, R_f = 0.22). En la reacción también se obtiene un 25% de H-Pro-OMe. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de ambos derivados **183** se recogen en la Tabla 5.20.

Reacción de lactamización de H-GlyΨ(R)CH(CN)N]Pro-OMe·HCl [(R)-182]. Síntesis de ciclo(GlyΨ[CH(CN)N]Pro) [(R)- y (S)-183]:

A una disolución del clorhidrato (R)-**182** (68 mg, 0.29 mmol) en 3 mL de una mezcla DCM/MeOH (4:1) se añaden 41 μL (0.29 mmol) de Et₃N y se deja reaccionar a 40 °C durante 5 días. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna en AcOEt/Acetona (1:1)

obteniendo los diastereoisómeros (**R**)-**183** (19 mg, 40%, $R_f = 0.36$) y (**S**)-**183** (4 mg, 7%, $R_f = 0.22$), epímeros en el carbono que soporta el grupo ciano. En este caso, se recupera un 16% de H-Pro-OMe. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de los derivados **183** se recogen en la Tabla 5.20.

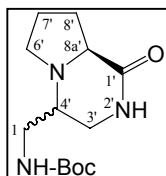
Tabla 5.20. Datos analíticos y espectroscópicos más característicos de **180**, (**R**)-, y (**S**)-**183**.



	180	(R)- 183	(S)- 183
R	H	CN	CN
Rdto. (%)	76	20-40 ^d	7-8 ^d
P.f. (°C)	237-240 ^a	Sólido amorfo	Espuma
$[\alpha]_D^{20}$	-32.1 (c 0.9, MeOH)	-12.3 (c 0.8, MeOH)	-22.3 (c 0.5, MeOH)
EM-ES (m/z)	141 [M ⁺ +1]	166 [M ⁺ +1]	166 [M ⁺ +1]
¹ H-RMN ^{b, c}			
H ₂	8.25 (m)	7.15 (m)	7.79 (m)
H ₃	3.52-3.41 (m)	3.75 (dd, -12.2, 5.4) y 3.52 (dt, -12.2, 2.3)	3.67 (ddd, -12.5, 6.3, 3.4) y 3.64 (ddd, -12.5, 3.7, 2.7)
H ₄	3.45 y 3.26 (m)	4.10 (dd, 5.4, 2.0)	4.07 (dd, 6.4, 3.9)
H ₆	3.61 y 3.28 (m)	3.00 y 2.67 (m)	3.10-3.04 (m)
H ₇	2.08-1.82 (m)	1.88-1.82 (m)	2.02 y 1.82 (m)
H ₈	2.38 y 2.09 (m)	2.21 y 1.90 (m)	2.23 y 2.07 (m)
H _{8a}	4.21 (t, 8.8)	3.27 (t, 8.1)	3.64 (t, 8.2)
¹³ C-RMN ^b			
C ₁	168.4	170.7	171.9
C ₃	36.9	44.3	42.8
C ₄	46.2	48.0	48.7
C ₆	55.4	51.1	51.2
C ₇	21.8	21.1	23.0
C ₈	28.0	25.5	28.1
C _{8a}	61.5	60.1	61.9
R	---	115.0	117.2

a) P.f. lit.¹⁴⁶ = 242-243 °C. b) Los espectros de **180** y (**R**)-, (**S**)-**183** se realizaron a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN en muestras disueltas en H₂O/D₂O para **180** y CDCl₃ para **183**. Valores de desplazamiento químico en ppm. c) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). d) El rendimiento varía según el derivado de partida utilizado.

Síntesis de (4'R, 8a'S)- y (4'S, 8a'S)-(1'-oxoperhidropirrololo[1,2-a]pirazin-4'-il)metilcarbamato de terc-butilo [(R,S)-184]:

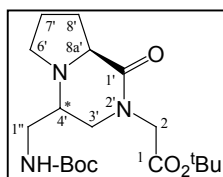


Sobre una disolución de la mezcla epimérica de pseudodipéptidos **(R,S)-181** en proporción 65:35 (345 mg, 1.16 mmol) en MeOH (15 mL) enfriada a 0 °C, se añaden aproximadamente 500 mg (150% en peso) de Ni Raney y se hidrogena a 20 p.s.i. durante 19 horas a temperatura ambiente. Finalizada la reacción, se filtra el catalizador sobre celita y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía en columna en DCM/MeOH (20:1) aislando la mezcla epimérica de pirrolpirazinas **(R,S)-184**^{§§§} como un aceite incoloro (36%). Los intentos de separación cromatográfica de los mismos fueron infructuosos. También se obtiene en esta reacción el pseudopéptido lineal descrito anteriormente **178** (33%). Los datos espectroscópicos de la mezcla **(R,S)-184** se recogen a continuación. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.02 (m, 1H, H₂-May), 6.72 (m, 1H, H₂-min), 5.13 (m, 1H, NH-Boc-May), 5.01 (m, 1H, NH-Boc-min), 3.76-3.67 (m, 2H, H_{8a}-May, H₄-min), 3.52 (m, 1H, H₃-May), 3.42-3.14 (m, 8H, H₃-May, 2H₃-min, H_{8a}-min, 4H₁), 3.10 (m, 1H, H₆-May), 2.92 (m, 1H, H₄-May), 2.83 (m, 1H, H₆-min), 2.67 (m, 1H, H₆-May), 2.55 (m, 1H, H₆-min), 2.25-1.91 (m, 4H, H₈), 1.88-1.73 (m, 4H, H₇), 1.42 (s, 18H, ^tBu); ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.8 (C₁-May), 173.0 (C₁-min), 156.0 (Boc-CO), 79.6 y 79.5 (C-(CH₃)₃), 63.5 (C_{8a}-min), 58.4 (C_{8a}-May), 55.7 (C₄-May), 55.0 (C₆-May), 52.9 (C₄-min), 46.2 (C₆-min), 41.9-40.8 (C₁, C₃ y C_{8a}), 28.3 (C-(CH₃)₃), 28.0 (C₈-May), 26.2 (C₈-min), 23.8 (C₇-May), 22.1 (C₇-min); **EM-ES** (m/z): 292 (11) [M⁺+Na], 270 (100) [M⁺+1].

N-carboxialquilación de (R,S)-184. Síntesis de (4'R, 8a'S)- y (4'S, 8a'S)-2-[4'-(terc-butoxicarbamoilmetil)-1'-oxoperhidropirrololo[1,2-a]pirazin-2'-il]acetato de terc-butilo [(R)- y (S)-185]:

A una disolución de la mezcla de pirrolpirazinas **(R,S)-184** (86 mg, 0.32 mmol), en THF anhidro (5 mL), y enfriada a 0 °C, se añade NaH en forma de suspensión al 60%

^{§§§} Hay que señalar que, en los compuestos resultantes de la hidrogenación de pseudopéptidos cianometilnamino, el orden de prelación de los sustituyentes sobre el centro estereogénico del enlace pseudopéptido cambia, de forma que los epímeros (*R*), tras la reducción del grupo CN, dan lugar a epímeros de configuración (*S*), y viceversa.

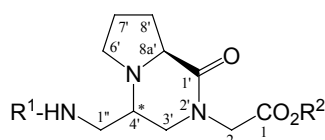


en aceite mineral (15 mg, 0.38 mmol) y se agita durante 15 minutos a la misma temperatura en atmósfera de Árgon. A continuación se añade bromoacetato de *terc*-butilo (57 μ L, 0.38 mmol) y se deja reaccionar alcanzando temperatura ambiente durante un intervalo de 1 a 1.5 horas hasta la completa consumición del producto de partida. Se evapora el disolvente a sequedad y el residuo resultante se disuelve en CH_2Cl_2 (10 mL) y se lava con HCl 1N (10 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica varias veces en Éter/MeOH (10:1) aislándose los diastereoisómeros (*R*)-**185** (42 mg, 34%, $R_f = 0.34$) y (*S*)-**185** (50 mg, 41%, $R_f = 0.29$)****. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en la Tabla 5.21.

Eliminación de los grupos protectores Boc y ^tBu de (R)- y (S)-185. Síntesis de los ácidos (4'R, 8a'S)- y (4'S, 8a'S)-2-[4'-(terc-butoxicarbamoilmetil)-1'-oxoperhidropirrol[1,2-a]pirazin-2'-il]acético, (R)- y (S)-186:

Al correspondiente derivado de pirrolopirazina *N*- y *C*-protegido (*R*)- o (*S*)-**185** se le añade TFA y se deja reaccionar durante 18 horas, según el procedimiento general descrito con anterioridad, para dar los correspondientes derivados de pirrolopirazina desprotegidas (*R*)- o (*S*)-**186** tras liofilizar. Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en la Tabla 5.21.

**** Cabe destacar que en los compuestos (*R*)- y (*S*)-**185** resultantes de la *N*-carboxialquilación en posición 2' de (*S*)- y (*R*)-**184**, el orden de prelación de los sustituyentes sobre el centro estereogénico del enlace pseudopeptídico cambia respecto a su correspondiente antecesor, de forma que los epímeros (*R*), dan lugar a epímeros de configuración (*S*), y viceversa.

Tabla 5.21. Datos analíticos y espectroscópicos más característicos de (*R*)-, (*S*)-**185** y (*R*)-, (*S*)-**186.**

	(<i>R</i>)- 185	(<i>S</i>)- 185	(<i>R</i>)- 186	(<i>S</i>)- 186
R ₁	Boc	Boc	H	H
R ₂	^t Bu	^t Bu	H	H
Rdto. (%)	34	41	98	96
P.f. (°C)	Aceite	Aceite	136-139 °c	Sólido céreo
[α] _D ²⁰	-33.4 (c 0.8, CHCl ₃)	-23.5 (c 1.3, CHCl ₃)	-22.3 (c 0.2, MeOH)	-37.1 (c 0.3, MeOH)
EM-ES (m/z)	384 [M ⁺ +1]	384 [M ⁺ +1]	228 [M ⁺ +1]	228 [M ⁺ +1]
¹H-RMN^{a, b}				
H ₂	4.08 y 3.87 (AB, -17.4)	4.06 y 3.99 (AB, -17.4)	4.22 y 4.02 (AB, -17.7)	4.18 y 4.06 (AB, -17.9)
H _{3'}	3.51 (t, 10.6) y 3.17 (m)	3.56 (dd, -12.6, 3.7) y 3.24 (dd, -12.6, 5.6)	3.85 (dd, -13.5, 11.7) y 3.70 (dd, -13.4, 3.8)	3.96 (m) y 3.66 (dd, -15.6, 6.3)
H _{4'}	3.20 (m)	3.05 (m)	4.35 (m)	3.93 (m)
H _{6'}	2.89 y 2.55 (m)	3.06 y 2.70 (m)	3.48 y 3.34 (m)	3.73 y 3.32 (m)
H _{7'}	1.91-1.74 (m)	1.90-1.71 (m)	2.06 y 1.98 (m)	1.03 y 1.86 (m)
H _{8'}	2.16 y 2.00 (m)	2.21 y 2.02 (m)	2.32 y 2.19 (m)	2.37 y 2.15 (m)
H _{8a'}	3.37 (dd, 7.8, 6.8)	3.75 (dd, 8.4, 6.8)	4.49 (dd, 8.2, 4.7)	4.40 (t, 8.0)
H _{1''}	3.32 y 3.22 (m)	3.35 y 3.20 (m)	3.41 (dd, -14.0, 5.7) y 3.32 (dd, -14.0, 7.4)	3.48-3.37 (m)
¹³C-RMN^a				
C ₁	171.2	172.1	171.5	171.8
C ₂	48.7	48.9	49.2	48.9
C _{1'}	167.8	168.2	166.6	166.6
C _{3'}	48.2	46.7	44.4	45.3
C _{4'}	55.2	55.3	52.8	55.6
C _{6'}	46.3	52.8	47.8	55.9
C _{7'}	22.3	24.0	22.1	22.9
C _{8'}	26.8	28.8	28.0	28.7
C _{8a'}	63.9	58.6	63.4	61.0
C _{1''}	41.1	41.3	37.6	37.4

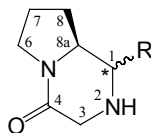
a) Los espectros de (*R*)-, (*S*)-**185** y (*R*)-, (*S*)-**186** se realizaron a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN en muestras disueltas en CDCl₃ y D₂O respectivamente. Valores de desplazamiento químico en ppm. b) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). c) Recristalizado en MeOH/Et₂O.

*4-Oxoperhidropirrollo[1,2-a]pirazinas****Síntesis de ciclo(Pro Ψ[CH₂NH]Gly)·AcOH (189) mediante reacción de lactamización de H-Pro Ψ[CH₂NH]Gly-OMe·HCl (188):***

Se disuelven 173 mg (0.70 mmol) del pseudodipéptido **188** en 5 mL de AcOH/*i*-BuOH 0.1M y se lleva a reflujo durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente a vacío y se purifica mediante cromatografía en columna en DCM/MeOH (5:1) obteniendo el derivado de 4-oxopirrolpirazina **189** como un sólido céreo (102 mg, 74%). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos se encuentran recogidos en la Tabla 5.22.

Obtención de ciclo(Pro Ψ[CH(CN)NH]Gly) [(R)- y (S)-192] mediante reacción de lactamización de H-Pro Ψ[CH(CN)NH]Gly-OMe·HCl [(R,S)-191]:

A una disolución de la mezcla pseudodipéptidica (**R,S**)-**191** (61 mg, 0.26 mmol) en 3 mL de CH₂Cl₂ se añaden 36 μL (0.26 mmol) de Et₃N y se deja reaccionar a t.a durante 48 horas. Pasado este tiempo se elimina el disolvente a presión reducida, obteniendo una mezcla de diastereoisómeros (**R,S**)-**192** en una proporción aproximada de 70:30, según el espectro de ¹H-RMN del bruto de reacción. El residuo resultante se purifica por cromatografía radial en DCM/MeOH (10:1), obteniendo los derivados de 4-oxopirrolpirazinas (**R**)-**192** (23 mg, 54%, **R_f** = 0.70) y (**S**)-**192** (12 mg, 29%, **R_f** = 0.65). Los datos analíticos y espectroscópicos más característicos de estos análogos se recogen en la Tabla 5.22.

Tabla 5.22. Datos analíticos y espectroscópicos de los derivados de **189** y (*R*)-, (*S*)-**192**.

	189	(<i>R</i>)- 192	(<i>S</i>)- 192
R	H	CN	CN
Rdto. (%)	74	54	29
<i>P.f.</i> (°C) ^a	Sólido céreo	103-105	131-134
$[\alpha]_D^{20}$	+11.7 (c 1, MeOH)	-31.2 (c 0.8, CHCl ₃)	-24.1 (c 0.4, CHCl ₃)
<i>EM-ES</i> (m/z)	141 [M ⁺ +1]	166 [M ⁺ +1]	166 [M ⁺ +1]
¹ H-RMN ^{b, c}			
H ₁	3.15 (dd, 13.2, 3.4) y 2.27 (dd, 13.2, 10.7)	3.52 (d, 9.0)	4.32 (d, 3.8)
H ₃	3.26 y 3.09 (AB, -18.4)	3.64 y 3.47 (AB, -17.7)	3.73 y 3.66 (AB, -17.1)
H ₆	3.37-3.22 (m)	3.76-3.49 (m)	3.65 y 3.55 (m)
H ₇	1.80 y 1.62 (m)	2.06 y 1.86 (m)	2.09 y 1.84 (m)
H ₈	1.90 y 1.24 (m)	2.34 y 1.62 (m)	2.15 y 1.87 (m)
H _{8a}	3.39 (m)	3.71 (m)	3.82 (m)
¹³ C-RMN ^b			
C ₁	46.5	49.8	48.6
C ₃	46.3	48.1	45.4
C ₄	169.7	165.8	164.8
C ₆	45.4	45.4	44.0
C ₇	21.6	21.5	21.7
C ₈	29.9	30.3	29.2
C _{8a}	58.7	61.0	58.8
R	---	116.9	115.9

a) Compuestos recristalizados en MeOH/Et₂O. b) Los espectros de **189** y (*R*)-, (*S*)-**192** se realizaron a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN en muestras disueltas en D₂O y CDCl₃, respectivamente. Valores de desplazamiento químico en ppm. c) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz).

5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

5.3.1. FIJACIÓN A RECEPTORES DE GluRs¹¹⁰

Preparación de tejido.

Se extrae la corteza cerebral de ratas Wistar de 250-300 g y se homogeneiza en sacarosa 0.32 M. Se centrifuga a 1000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se vuelve a centrifugar a 10.000 g durante 20 minutos. La capa superior del pellet se suspende en 20 volúmenes de agua fría y se centrifuga a 50.000 g durante 20 minutos. Este procedimiento se repite durante 3 veces. El día del experimento el pellet se mantiene a temperatura ambiente durante 20 minutos y se resuspende en 20 volúmenes de buffer Tris (pH 7.49) y se centrifuga a 50.000 g durante 20 minutos. Este procedimiento se repite un total de tres veces con el fin de reducir el contenido de glutamato endógeno a niveles que no interfieran con los ensayos de desplazamiento de radioligando.

Ensayos de desplazamiento de ácido L-[³H]-glutámico.

Los ensayos de desplazamiento se realizan en buffer Tris-acetato 50 mM (pH 7.0) conteniendo 50-100 µg de proteína (tejido), 10 nM de ácido L-[³H]-glutámico y una

adecuada concentración de los productos a ensayar, en un volumen final de 0.5 mL. La mezcla se incuba durante 15 minutos a 2 °C y se filtra a través de filtros Whatman GF/B en un “Brandel Cell Harvester”. Los filtros se recogen en viales de plástico sobre los que se añade 3 mL de líquido de centelleo, tras lo cual se mide la radioactividad. La fijación no específica se determina por desplazamiento con ácido L-glutámico 1 mM.

5.3.2. NEUROPROTECCIÓN EN CULTIVOS CELULARES^{114, 115}

Obtención de cultivos primarios.

Se prepararon los cultivos a partir de embriones de 18 días, obtenidos de ratas gestantes de la raza Wistar (Harlan). Tras la obtención de los cerebros fetales, se limpian las meninges y se disecciona el hipocampo. El tejido se disgrega de manera mecánica por pases sucesivos a través de pipetas *pasteur* siliconizadas, hasta la obtención de una suspensión homogénea. Las células se depositan en placas de cultivo tratadas previamente con una solución de poli-L-lisina (10 µg/mL) a razón de 3×10^5 células/mL, y se incuban a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% CO₂. Así, se preparan cultivos enriquecidos en células neuronales, empleando como medio de cultivo Neurobasal® (Gibco, BRL) reconstituido con glutamina 0.5 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL y suplementado con B27 (2%, Gibco, BRL). Este medio reduce el crecimiento de células gliales, hecho que fue confirmado mediante marcaje inmunocitoquímico, observándose la práctica ausencia de células gliales GFAP-positivas (<5%) en estas condiciones de cultivo. En todos los casos, el medio se renueva cada 72 horas, y los estudios se realizan sobre cultivos de 11 días.

Modelo de excitotoxicidad por exposición a NMDA.

Tras retirar el medio de cultivo, las placas se lavan con solución de Locke de la siguiente composición: 5 mM HEPES (pH 7.4), 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, 3.6 mM NaHCO₃ y 5.6 mM glucosa. Posteriormente, se realiza una preincubación de 10 min a 37°C con distintas concentraciones de los compuestos en estudio en la solución indicada y tras este periodo se añade NMDA 0.5 mM. La exposición a la excitotoxina se lleva a cabo durante 3 h, manteniéndose los cultivos a 37°C en atmósfera de CO₂. A continuación, se retira la solución de Locke, y se sustituye por medio Neurobasal[®], que contiene asimismo los compuestos en estudio manteniéndose los cultivos durante 24 h a 37°C en presencia de CO₂ al 5%.

Modelo de anoxia y privación de glucosa.

En el momento del ensayo, el medio de cultivo se sustituye por buffer de la siguiente composición: 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 0.8 mM MgSO₄, 1.18 mM NaH₂PO₄ y 25 mM 2-desoxi-D-glucosa. Las placas de cultivo se transfieren a una cámara anaeróbica (Forma Scientific, Hucoa Erloss), y se incuban durante 150 min a 37°C en atmósfera de N₂/CO₂. Transcurrido este periodo, se retira el buffer, se añade medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con glucosa 33 mM, y las placas se incuban durante 18 horas en presencia de CO₂ al 5%. Los compuestos se añaden a diferentes concentraciones, tanto al buffer de incubación durante el tiempo de anoxia como al medio de cultivo durante todo el periodo de post-anoxia.

En todos los ensayos se realiza un cultivo control en el que el medio de cultivo Neurobasal[®] se sustituye por buffer de la composición indicada, pero al que se adiciona glucosa 33 mM en lugar de 2-desoxi-D-glucosa, y se mantiene en atmósfera normal de 5% CO₂ durante todo el estudio.

5.4. APÉNDICE: DATOS DE ANÁLISIS DE COMBUSTIÓN

Comp.	Fórmula empírica	Calculado (%)			Encontrado (%)		
		C	H	N	C	H	N
16	C ₂₁ H ₂₆ F ₃ N ₃ O ₈	49.90	5.18	8.31	49.56	5.42	7.97
17	C ₁₆ H ₂₂ F ₃ N ₃ O ₁₀	40.60	4.68	8.88	40.29	4.96	8.53
18	C ₂₀ H ₃₀ F ₆ N ₄ O ₁₀	40.00	5.04	9.33	40.36	5.25	8.99
19	C ₁₈ H ₂₈ F ₃ N ₃ O ₈	45.86	5.99	8.91	45.51	6.21	8.74
20	C ₁₈ H ₂₈ F ₃ N ₃ O ₈	45.86	5.99	8.91	45.48	6.36	8.58
21	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₇	48.98	6.17	12.24	48.72	6.22	12.20
22	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₆	50.35	6.34	9.79	50.26	6.41	9.73
23	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₆	45.99	5.96	14.63	46.20	5.63	14.75
24	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₆	45.99	5.96	14.63	45.71	5.89	14.88
26	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ O ₆	49.52	6.71	13.33	49.77	6.84	13.18
27	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ O ₆	49.52	6.71	13.33	49.80	6.90	12.95
29	C ₁₅ H ₂₄ N ₄ O ₆	50.55	6.79	15.72	50.33	6.99	15.41
30	C ₁₃ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₈	38.91	4.52	10.47	38.84	4.73	10.27
31	C ₁₆ H ₂₄ F ₃ N ₃ O ₈	43.34	5.46	9.48	43.56	5.32	9.35
32	C ₁₅ H ₂₂ F ₃ N ₃ O ₈	41.96	5.16	9.79	41.68	5.31	9.59
33	C ₁₃ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₈	38.91	4.52	10.47	38.80	4.33	10.67
34	C ₁₆ H ₂₂ F ₆ N ₄ O ₁₀	35.30	4.07	10.29	34.91	4.19	10.51
35	C ₁₄ H ₂₀ F ₃ N ₃ O ₉	38.99	4.67	9.74	38.65	4.96	9.52
36	C ₁₈ H ₂₆ F ₃ N ₃ O ₈	46.06	5.58	8.95	45.87	5.81	8.70

37	$C_{16}H_{22}F_3N_3O_8$	43.54	5.02	9.52	43.79	5.10	9.22
38	$C_{15}H_{22}F_3N_3O_8S$	39.05	4.81	9.11	38.76	4.63	9.45
39	$C_{13}H_{21}N_3O_6$	49.52	6.71	13.33	49.60	6.53	13.44
40	$C_{13}H_{18}F_3N_3O_8S$	36.03	4.19	9.70	35.74	4.32	9.42
41	$C_{14}H_{23}N_3O_6$	51.06	7.04	12.76	50.74	7.26	12.13
42	$C_{14}H_{23}N_3O_6$	51.06	7.04	12.76	50.95	7.15	12.73
43	$C_{12}H_{19}N_3O_6$	47.84	6.36	13.95	47.73	6.56	14.29
44	$C_{12}H_{19}N_3O_6$	47.84	6.36	13.95	47.83	6.38	13.64
57	$C_{17}H_{29}N_3O_6$	54.97	7.87	11.31	55.18	7.62	11.40
58	$C_{17}H_{29}N_3O_6$	54.97	7.87	11.31	55.13	7.74	11.56
59	$C_{23}H_{33}N_3O_6$	61.73	7.43	9.39	61.95	7.56	9.12
60	$C_{30}H_{43}N_3O_{10}$	59.49	7.16	6.94	59.26	7.31	6.92
61	$C_{30}H_{52}N_4O_{10}$	57.31	8.34	8.91	57.14	8.48	8.73
62	$C_{25}H_{43}N_3O_8$	58.46	8.44	8.18	58.73	8.68	8.04
63	$C_{25}H_{43}N_3O_8$	58.46	8.44	8.18	58.29	8.66	8.41
64	$C_{23}H_{37}N_3O_{10}$	53.58	7.23	8.15	53.42	7.31	8.11
67	$C_{28}H_{33}N_3O_7$	64.23	6.35	8.03	64.17	6.49	7.99
68	$C_{26}H_{30}N_2O_6$	66.94	6.48	6.00	60.86	6.54	5.98
71	$C_{25}H_{31}NO_6$	68.01	7.08	3.17	67.77	7.24	3.00
72	$C_{25}H_{31}NO_6$	68.01	7.08	3.17	67.93	7.35	2.97
77	$C_{33}H_{35}N_3O_8$	65.88	5.86	6.98	65.52	5.99	6.71
78	$C_{33}H_{35}N_3O_8$	65.88	5.86	6.98	65.61	6.02	6.87
80	$C_{35}H_{39}N_3O_8$	66.76	6.24	6.67	66.92	6.05	6.71
81	$C_{35}H_{39}N_3O_8$	66.76	6.24	6.67	66.87	5.92	6.96

83	$C_{23}H_{33}N_3O_6$	61.73	7.43	9.39	61.94	7.78	9.02
84	$C_{20}H_{26}F_3N_3O_6$	52.06	5.68	9.11	51.78	5.82	8.97
85	$C_{22}H_{30}N_4O_6$	59.18	6.77	12.55	59.31	6.72	12.72
102	$C_{15}H_{25}N_3O_6$	52.47	7.34	12.24	52.11	7.09	12.60
103	$C_{18}H_{31}N_3O_6$	56.09	8.11	10.90	55.97	8.17	10.74
104	$C_{17}H_{29}N_3O_6$	54.97	7.87	11.31	54.67	7.90	11.09
105	$C_{15}H_{25}N_3O_6$	52.47	7.34	12.24	52.22	7.48	12.01
106	$C_{21}H_{36}N_4O_8$	53.38	7.68	11.86	53.36	7.54	11.75
107	$C_{20}H_{35}N_3O_7$	55.93	8.21	9.78	55.69	8.48	9.53
108	$C_{20}H_{33}N_3O_6$	58.38	8.08	10.21	58.61	8.20	9.99
109	$C_{18}H_{29}N_3O_6$	56.38	7.62	10.96	56.07	7.95	10.60
112	$C_{26}H_{45}N_3O_8S$	55.79	8.10	7.51	55.95	7.98	7.66
113	$C_{32}H_{40}N_2O_7S$	64.41	6.76	4.89	64.33	6.96	4.70
114	$C_{17}H_{30}N_2O_5S$	54.52	8.07	7.48	54.78	8.20	7.12
115	$C_{24}H_{41}N_3O_8S$	54.22	7.77	7.90	54.54	7.50	7.71
116	$C_{30}H_{38}N_2O_7$	66.90	7.11	5.20	66.64	7.26	5.41
117	$C_{25}H_{31}ClN_2O_5$	63.22	6.58	5.90	63.00	6.71	6.24
118	$C_{35}H_{39}N_3O_8$	66.76	6.24	6.67	66.53	6.47	6.95
121	$C_{31}H_{40}N_2O_7$	67.37	7.30	5.07	67.16	7.45	5.01
122	$C_{31}H_{40}N_2O_7$	67.37	7.30	5.07	67.29	7.61	9.94
123	$C_{26}H_{33}ClN_2O_5$	63.86	6.80	5.73	63.55	6.99	5.49
124	$C_{26}H_{33}ClN_2O_5$	63.86	6.80	5.73	63.60	6.58	5.96
125	$C_{36}H_{41}N_3O_8$	67.17	6.42	6.53	66.88	6.52	6.24
126	$C_{36}H_{41}N_3O_8$	67.17	6.42	6.53	67.09	6.48	6.71

127	$C_{29}H_{36}N_2O_7$	66.39	6.92	5.34	66.15	6.87	5.62
128	$C_{29}H_{36}N_2O_7$	66.39	6.92	5.34	66.01	7.18	5.09
129	$C_{24}H_{29}ClN_2O_5$	62.54	6.34	6.08	62.23	6.50	5.89
130	$C_{24}H_{29}ClN_2O_5$	62.54	6.34	6.08	62.15	6.66	6.17
131	$C_{34}H_{37}N_3O_8$	66.33	6.06	6.83	66.14	6.43	6.78
132	$C_{34}H_{37}N_3O_8$	66.33	6.06	6.83	65.98	6.11	7.02
133	$C_{12}H_{21}N_3O_5$	50.16	7.37	14.63	49.96	7.12	14.31
134	$C_{14}H_{22}F_3N_3O_7$	41.90	5.53	10.47	42.23	5.71	10.29
139	$C_{29}H_{38}N_2O_6$	68.21	7.50	5.49	68.55	7.27	5.68
141	$C_{34}H_{39}N_3O_7$	67.87	6.53	6.98	67.50	6.27	7.29
142	$C_{27}H_{31}N_3O_6$	65.71	6.33	8.51	65.72	6.54	8.26
143	$C_{12}H_{19}N_3O_4$	53.52	7.11	15.60	53.35	7.22	15.47
145	$C_{18}H_{32}N_2O_5$	60.65	9.05	7.86	60.52	9.16	7.80
146	$C_{25}H_{45}N_3O_7$	60.10	9.08	8.41	59.84	9.32	8.26
(R)-147	$C_{30}H_{37}N_3O_6$	67.27	6.96	7.84	67.00	7.14	7.68
(S)-147	$C_{30}H_{37}N_3O_6$	67.27	6.96	7.84	67.06	7.25	8.01
(R)-149	$C_{26}H_{27}N_3O_5$	67.66	5.90	9.10	67.94	5.83	9.33
(S)-149	$C_{26}H_{27}N_3O_5$	67.66	5.90	9.10	67.39	5.62	9.27
(R)-150	$C_{35}H_{38}N_4O_7$	67.08	6.11	8.94	66.78	6.28	9.00
(S)-150	$C_{35}H_{38}N_4O_7$	67.08	6.11	8.94	67.35	6.31	8.69
(R)-151	$C_{28}H_{30}N_4O_6$	64.85	5.83	10.80	64.56	5.75	11.05
(S)-151	$C_{28}H_{30}N_4O_6$	64.85	5.83	10.80	64.59	5.53	10.74
(R)-152	$C_{13}H_{18}N_4O_4$	53.05	6.16	19.04	53.32	6.44	19.09
(S)-152	$C_{13}H_{18}N_4O_4$	53.05	6.16	19.04	53.23	5.81	18.81

(R)-153	$C_{26}H_{44}N_4O_7$	59.52	8.45	10.68	59.19	8.35	10.94
(S)-153	$C_{26}H_{44}N_4O_7$	59.52	8.45	10.68	59.48	8.49	10.76
(R)-156	$C_{17}H_{31}N_3O_5$	57.12	8.74	11.76	56.86	8.94	11.59
(S)-156	$C_{17}H_{31}N_3O_5$	57.12	8.74	11.76	56.77	8.51	11.91
(R)-157	$C_{10}H_{14}F_3N_3O_4$	40.41	4.75	14.14	40.19	4.28	14.36
(S)-157	$C_{10}H_{14}F_3N_3O_4$	40.41	4.75	14.14	40.34	4.52	14.27
(R)-158	$C_{23}H_{41}N_3O_7$	58.58	8.76	8.91	58.73	8.52	9.05
(R)-159	$C_{12}H_{16}F_3N_3O_6$	40.57	4.54	11.83	40.95	4.21	12.01
(S)-159	$C_{12}H_{16}F_3N_3O_6$	40.57	4.54	11.83	40.74	4.28	12.14
(R)-160	$C_{23}H_{41}N_3O_7$	58.58	8.76	8.91	58.59	8.50	9.11
(S)-160	$C_{23}H_{41}N_3O_7$	58.58	8.76	8.91	58.29	8.83	8.97
(R)-162	$C_{10}H_{15}N_3O_4$	49.79	6.27	17.42	49.56	6.40	17.53
(S)-162	$C_{10}H_{15}N_3O_4$	49.79	6.27	17.42	49.63	6.08	17.66
165	$C_{14}H_{24}N_2O_5$	55.98	8.05	9.33	56.09	8.23	9.04
166	$C_{15}H_{26}N_2O_5$	57.31	8.34	8.91	57.26	8.11	9.18
167	$C_9H_{17}ClN_2O_3$	45.67	7.24	11.84	45.44	7.00	12.03
168	$C_{10}H_{19}ClN_2O_3$	47.90	7.64	11.17	48.24	7.56	11.31
169	$C_8H_{12}N_2O_2$	57.13	7.19	16.66	57.30	7.01	16.70
170	$C_9H_{14}N_2O_2$	59.32	7.74	15.37	59.28	7.85	15.52
171	$C_{12}H_{20}N_2O_5S$	47.35	6.62	9.20	47.25	6.44	9.23
172	$C_7H_{13}ClN_2O_3S$	34.93	5.44	11.64	35.29	5.19	11.55
173	$C_6H_8N_2O_2S$	41.85	4.68	18.58	41.72	4.50	18.81
177	$C_8H_{12}N_2O_2$	57.13	7.19	16.66	57.30	7.28	16.49
180	$C_7H_{12}N_2O$	59.98	8.63	19.98	59.76	8.89	19.79

(R)-181	C ₁₄ H ₂₃ N ₃ O ₄	56.55	7.80	14.13	56.28	8.00	14.04
(S)-181	C ₁₄ H ₂₃ N ₃ O ₄	56.55	7.80	14.13	56.16	7.93	14.41
(R)-183	C ₈ H ₁₁ N ₃ O	58.17	6.71	25.44	58.41	6.56	25.66
(S)-183	C ₈ H ₁₁ N ₃ O	58.17	6.71	25.44	57.97	6.60	25.72
(R)-185	C ₁₃ H ₂₃ N ₃ O ₃	57.97	8.61	15.60	57.63	8.49	15.69
(S)-185	C ₁₃ H ₂₃ N ₃ O ₃	57.97	8.61	15.60	57.77	8.42	15.81
(R)-186	C ₁₂ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₅	42.23	5.32	12.31	42.61	5.17	12.06
(S)-186	C ₁₂ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₅	42.23	5.32	12.31	42.48	5.02	12.13
187	C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₄	57.33	8.88	10.29	57.06	9.24	10.32
189	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₃	53.98	8.05	13.99	53.77	7.79	14.13
(R)-192	C ₈ H ₁₁ N ₃ O	58.17	6.71	25.44	57.90	6.45	25.78
(S)-192	C ₈ H ₁₁ N ₃ O	58.17	6.71	25.44	58.23	6.54	25.34

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Anlar, B.; Sullivan, K. A.; Feldman, E. L. Insuline-Like Growth Factor-I and Central Nervous System Development. *Horm. Metab. Res.* **1999**, *31*, 120-125.
2. Aberg, M. A.; Aberg, N. D.; Hedbacker, H.; Oscarsson, J.; Erijsson, P. S. Peripheral Infusion of IGF-1 Selectively Induces Neurogenesis in the Adult Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 2896-2903.
3. a) Doré, S.; Kar, S.; Quirion, R. Insulin-Like Growth Factor I Protects and Rescues Hippocampal Neurons Against β -Amyloid- and Human Amylin-Induced Toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4772-4777. b) Loddick, S. A.; Liu, X.-J.; Lu, Z.-X.; Liu, C.; Behan, D. P.; Chalmers, D. C.; Foster, A. C.; Vale, W. W.; Ling, N.; De Souza, E. B. Displacement of Insulin-Like Growth Factors from their Binding Proteins as a Potential Treatment for Stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 1894-1898. c) Doré, S.; Kar, S.; Quirion, R. Rediscovering an old Friend, IGF-1: Potential Use in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci.* **1998**, *20*, 326-331.
4. a) Busiguina, S.; Fernández, A. M.; Barrios, V.; Clark, R.; Tolbert, D. L.; Berciano, J.; Torres-Alemán, I. Neurodegeneration is Associated to Changes in Serum Insuline-Like Growth Factors. *Neurobiol. Dis.* **2000**, *7*, 657-665. b) Carro, E.; Trejo, J. L.; Gómez-Isla, T.; Le Roith, D.; Torres-Alemán, I. Serum Insuline-Like Growth Factor I Regulates Brain Amyloid-Beta Levels. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 1390-1397.
5. Sara, V. R.; Carlsson-Skewirut, C.; Drakemberg, K.; Giacobini, M. B.; Hakansson, L.; Mirmiran, M.; Nordberg, A.; Olson, L.; Reinecke, M.; Stahlbom, P. A.; Nordqvist, A. C. S. The

- Biological Role of Truncated Insulin-Like Growth Factor-1 and the Tripeptide GPE in the Central Nervous System. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1993**, 692, 183-191.
6. Sizonenko, S. V.; Sirimanne, E. V.; Williams, C. E.; Gluckman, P. D. Neuroprotective Effects of the *N*-Terminal Tripeptide of IGF-1, Glycine-Proline-Glutamate, in the Immature Rat Brain After Hypoxic-Ischemic Injury. *Brain Res.* **2001**, 922, 42-50 y referencias allí indicadas.
 7. Saura, J.; Curatolo, L.; Williams, C. E.; Gatti, S.; Benatti, L.; Peeters, C.; Guan, J.; Dragunow, M.; Post, C.; Faull, R. L. M.; Gluckman, P. D.; Skinner, S. J. M. Neuroprotective Effects of Gly-Pro-Glu, the *N*-Terminal Tripeptide of IGF-1, in the Hippocampus in vitro. *NeuroReport* **1999**, 10, 161-164.
 8. Alexi, T.; Hughes, P. E.; Van Roon-Mom, W. M. C.; Faull, R. L. M.; Williams, C. E.; Clark, R. G.; Gluckman, P. D. The IGF-I Amino-Terminal Tripeptide Glycine-Proline-Glutamate (GPE) is Neuroprotective to Striatum in the Quinolinic Acid Lesion Animal Model of Huntington's Disease. *Exp. Neurol.* **1999**, 159, 84-97.
 9. Guan, J.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Gluckman, P. D.; Williams, C. E. The Effects of the *N*-Terminal Tripeptide of Insulin-Like Growth Factor-1, Glycine-Proline-Glutamate in Different Regions Following Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Adult Rats. *Neuroscience* **1999**, 89, 649-659.
 10. Guan, J.; Krishnamurthi, R.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Clark, R.; Gluckman, P. *N*-Terminal Tripeptide of IGF-1 (GPE) Prevents the Loss of TH Positive Neurons after 6-OHDA Induced Nigral Lesion in Rats. *Brain Res.* **2000**, 859, 286-292.
 11. Sara, V. R.; Carlsson-Skewir, C.; Bergman, T.; Jörnvall, H.; Roberts, P. J.; Crawford, M.; Hakansson, L. N.; Civalero, I.; Nordberg, A. Identification of Gly-Pro-Glu (GPE), the Aminoterminal Tripeptide of Insulin-Like Growth Factor 1 which is Truncated in Brain, as a Novel Neuroactive Peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 165, 766-771.
 12. Bourguignon, J. P.; Gerard, A. Role of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins in Limitation of IGF-1 Degradation into the *N*-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist GPE: Evidence from Gonadotrophine Hormone Secretion in Vitro at Two Developmental Stages. *Brain. Res.* **1999**, 846, 247-252.
 13. Batchelor, D. C.; Lin, H.; Wen, J.-Y.; Keven, C.; Van Zijl, P. L.; Breier, B. H.; Gluckman, P. D.; Thomas, G. B. Pharmacokinetics of Glycine-Proline-Glutamate, the *N*-Terminal Tripeptide of Insulin-Like Growth Factor-1, in Rats. *Anal. Biochem.* **2003**, 323, 156-163.
 14. Tran, L. H. Therapeutic Agent Composition and Method of Use. WO 03/041655.

15. Guan, J.; Gluckman, P. D.; Sieg, F. Ciclo(Prolyl-Glycine) and Methods of Use to Treat Neural Disorders. PCT Int. Appl. WO 03/039487.
16. Gudasheva, T. A.; Boyko, S. S.; Akparov, V. K.; Ostrovskaya, R. U.; Skoldinov, S. P.; Rozantsev, G. G.; Voronina, T. A.; Zherdev, V. P.; Seredenin, S. B. Identification of Novel Endogeneous Memory Facilitating Cyclic Dipeptide Cyclo-Prolylglycine in Rat Brain. *FEBS Lett.* **1996**, *391*, 149-152.
17. Gudasheva, T. A.; Ostrovskaya, R. U.; Trofimov, S. S.; Voronina, T. A.; Skoldinov, S. P.; Seredenin, S. B. New Endogenous Dipeptide Cycloprolyl-Glycine Is Similar to Piracetam by Its Memotropic Selectivity. *Bull. Exp. Biol. Med.* **1999**, *128*, 1012-1014.
18. a) Gudasheva, T. A.; Konstantinopolskii, M. A.; Ostrovskaya, R. U.; Seredenin, S. B. Anxiolytic Activity of Endogenous Nootropic Dipeptide Cycloprolylglycine in Elevated Plus-Maze Test. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2001**, *131*, 464-466. b) Seredenin, S. B.; Gudasheva, T. A.; Boiko, S. S.; Kovalev, G. I.; Voronin, M. V.; Yarkova, M. A. Endogenous Dipeptide Cycloprolylglycine Shows Selective Anxiolytic Activity in Animals With Manifest Fear Reaction. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2002**, *133*, 360-362.
19. Gudasheva, T. A.; Voronina, T. A.; Ostrovskaya, R. U.; Rozantsev, G. G.; Vasilevich, N. I.; Trofimov, S. S.; Kravchenko, E. V.; Skoldinov, A. P.; Seredenin, S. B. Synthesis and Antiamnesic Activity of a Series of *N*-Acylprolyl-Containing Dipeptides. *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, *31*, 151-157.
20. Gudasheva, T. A.; Boyko, S. S.; Ostrovskaya, R. U.; Voronina, T. A.; Akparov, V. K.; Trofimov, S. S.; Rozantsev, G. G.; Skoldinov, A. P.; Zherdev, V. P.; Seredenin, S. B. The Major Metabolite of Dipeptide Piracetam Analogue GVS-111 in Rat Brain and its Similarity to Endogenous Neuropeptide Cyclo-L-Prolylglycine. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1997**, *22*, 245-252.
21. Ostrovskaya, R. U.; Mirsoev, T. K.; Romanova, G. A.; Gudasheva, T. A.; Kravchenko, E. V.; Trofimov, C. C.; Voronina, T. A.; Seredenin, S. B. Proline-Containing Dipeptide GVS-111 Retains Nootropic Activity After Oral Administration. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2001**, *132*, 959-962.
22. Andreeva, N. A.; Stelmashuk, E. V.; Isaev, N. K.; Ostrovskaya, R. U.; Gudasheva, T. A.; Viktorov, I. V. Neuroprotective Properties of Nootropic Dipeptide GVS-111 in Vitro Oxygen-Glucose Deprivation, Glutamate Toxicity and Oxidative Stress. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2000**, *130*, 969-972.

23. Pelsman, A.; Hoyo-Vadillo, C.; Gudasheva, T. A.; Seredenin, S. B.; Ostrovskaya, R. U.; Busciglio, J. GVS-111 Prevents Oxidative Damage and Apoptosis in Normal and Down's Syndrome Human Cortical Neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2003**, *21*, 117-124.
24. Bayes, M.; Rabasseda, X.; Prous, J. R. Gateways to Clinical Trials. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2003**, *25*, 53-76.
25. a) Gouliaev, A. H.; Senning, A. Piracetam and Other Structurally Related Nootropics. *Brain. Res. Rev.* **1994**, *19*, 180-222. b) Gualtieri, F.; Manetti, D.; Romanelli, M. N.; Ghelardini, C. Design and Study of Piracetam-Like Nootropics, Controversial Members of the Problematic Class of Cognition-Enhancing Drugs. *Curr. Pharm. Design* **2002**, *8*, 125-138.
26. a) Parnetti, L.; Senin, U.; Mecocci, P. Cognitive Enhancement Therapy for Alzheimer's Disease. *Drugs* **1997**, *53*, 752-768. b) Croisile, B.; Trillet, M.; Fondarai, J.; Laurent, B.; Mauguire, F.; Billardon, M. Long-Term and High-Dose Piracetam Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurology* **1993**, *43*, 301-305.
27. a) Judd, A. K.; Schoolnik, G. K. Peptides: Chemistry, Biology, and Pharmacology. En *Advances in Pharmacology*. Vol. 21, August, T.; Anders, M. W.; Murad, F.; Niers, A. Eds., Academic Press, San Diego, **1990**, pp 221-285. b) Dutta, A. S. En *Advances in Drug Research*, Vol. 21, Testa, B. Ed., Academic Press, Londres, **1991**, pp 147-286.
28. Carr, A.; Jenny-Avital, E. R.; Lalezari, J. P.; Lazzarin, A.; Salgo, M. A. Enfuvirtide, an HIV-Fusion Inhibitor. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1770-1771.
29. Marx, V. Watching Peptide Drugs Grow Up. *Chem. Eng. News* **2005**, *83*, 17-24.
30. a) McMartin, C. Pharmacokinetics of Peptides and Proteins: Opportunities and Challenges. En *Advances in Drug Research*, Vol. 22, Testa, B. Ed., Academic Press, Londres, **1992**, pp. 41-106. b) Giannis, A.; Kolter T. Peptidomimetics for Receptor Ligands-Discovery, Development and Medical Perspectives. *Angew. Chem. Int.* **1993**, *32*, 1244-1267.
31. IUPAC. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry. *Pure & Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1129-1143.
32. La bibliografía sobre peptidomiméticos a lo largo de los últimos 20 años es muy extensa. Entre las revisiones sobre el tema, seleccionamos como libro de consulta general, por su actualidad y su amplitud el volumen monográfico 22c de *Methods of Organic Chemistry*, "Synthesis of Peptides and Peptidomimetics" Goodman, M.; Felix, A. Moroder, L.; Toniolo, C. Eds.; George Thieme Verlag: Stuttgart; **2003**.

33. a) Rees, D. C. Non-Peptide Ligands for Neuropeptide Receptors. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1993**, 28, 59-68. b) Wiley, R. A.; Rich, D. H. Peptidomimetics Derived From Natural Products. *Med. Res. Rev.*, **1993**, 13, 327-384. c) García López, M. T.; Herranz, R.; González Muñiz, R. Peptidomiméticos. En *Péptidos en Biología y Biomedicina*, Andreu, D. y Rivas L. Eds., CSIC: Madrid, **1997**, pp. 217-238.
34. a) Marshall, G. R. A Hierarchical Approach to Peptidomimetic Design. *Tetrahedron* **1993**, 49, 3547-3555. b) Olson, G. L.; Bolin, D. R.; Bonner, M. P.; Bös, M.; Cook, C. M.; Fry, D. C.; Graves, B. J.; Hatada, M.; Hill, D. E.; Kahn, M.; Madison, V. S.; Risiecki, V. K.; Sarabu, R.; Sepinwall, J.; Vicent, G. P.; Voss, M. E. Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 3039-3049. c) Moore, G. J. Designing Peptide Mimetics. *Trends Pharmacol. Sci.* **1994**, 15, 124-129. d) Goodman, M.; Ro, S. Peptidomimetics for Drug Design. En *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, vol. I Principles and Practice, Wolf, M. E. Ed., Wiley-Interscience Publ.: Nueva York, **1995**, pp. 803-861. e) Giannis, A.; Rübsam, F. Peptidomimetics in Drug Design. *Advances in Drug Research*, vol 29, Testa, B. Ed., Academic Press, Londres, **1997**, pp. 1-78. f) Hruby, V. J. Designing Peptide Receptor Agonists and Antagonists. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 847-858. g) Freidinger, R. M. Design and Synthesis of Novel Bioactive Peptides and Peptidomimetics. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5553-5566.
35. a) Spatola, A. F. Peptide Backbone Modifications: A Structure-Activity Analysis of Peptides Containing Amide Bond Surrogates, Conformational Constraints, and Related Backbone Replacements. En *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, vol. 7, Weinstein, B. Ed.; Marcel Dekker: Nueva York, **1983**, pp. 267-35. b) Ahn, J.-M.; Boyle, N. A.; MacDonald, M. T.; Janda, K.D. Peptidomimetics and Peptide Backbone Modifications. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2002**, 2, 463-473.
36. Wedemeyer, W. J.; Welker, E.; Scheraga, H. A. Proline Cis-Trans Isomerization and Protein Folding. *Biochemistry* **2002**, 41, 14637-14644 y referencias allí indicadas.
37. a) Yu, K. L.; Johnson, R. L. Synthesis and Chemical Properties of Tetrazole Peptide Analogs. *J. Org.Chem.* **1987**, 52, 2051-2059. b) Zabrocki, J.; Smith, G. D.; Dunbar J. B.; Iijima, H.; Marshall, G. R. Conformational Mimicry. 1,5-Disubstituted Tetrazole Ring as Surrogate for the Cis Amide Bond. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5875-5880.
38. Cativiela, C.; Diaz-de-Villegas, M. D. Stereoselective Synthesis of Quaternary α -Amino Acids. Part 1: Acyclic Compounds. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 3517-3599.

39. Hruby, V. J.; Han, G.; Gitu, P. M. Sección 9.1: Synthesis of Side-Chain Conformationally Restricted α -Amino Acids. Side-Chain-Modified Peptides. En *Methods of Organic Chemistry*. Vol E 22c *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*. Goodman, M.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C. Eds. George Thieme Verlag: Stuttgart, **2003**, pp. 3-51.
40. a) Cativiela, C.; Diaz-de-Villegas, M. D. Stereoselective Synthesis of Quaternary α -Amino Acids. Part 2: Cyclic Compounds. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 645-732. b) Thamm, P.; Musiol, H. J.; Moroder, L. Synthesis of Peptides Proline Analogues. Side-Chain-Modified Peptides. En *Methods of Organic Chemistry*. Vol E 22c *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*. Goodman, M.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C. Eds. George Thieme Verlag: Stuttgart, **2003**, pp. 52-86.
41. a) Hanessian, S.; Berstein, N.; Yang, R-Y.; Maguire, R. Asymmetric Synthesis of L-Azetidine-2-Carboxylic Acid and 3-Substituted Congeners-Conformationally Constrained Analogs of Phenylalanine, Naphthylalanine, and Leucine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1437-1442. b) Blanco, M. J.; Paleo, M. R.; Penide, C.; Sardina, F. J. Stereoselective Reactions of *N*-(9-phenylfluoren-9-yl)-4-oxoproline Enolates. An Expedient Route for the Preparation of Conformationally Restricted Amino Acid Analogues. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8786-8793. c) Pellegrini, N.; Schmitt, M.; Bourguignon J. Rapid Access to *Cis* 3-Substituted Prolines. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6779-6780. d) Karoyan, P.; Quancard, J.; Vaissermann, J.; Chassaing, G. Amino-Zinc-Enolate Carbometallation Reactions: Application to Ring Closure of Terminally Substituted Olefin for the Asymmetric Synthesis of *Cis*- and *Trans*-3-Prolinoleucine. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2256-2265. e) Soloshonok, V. A.; Ueki, H.; Tiwari, R.; Cai, C.; Hruby V. J. Virtually Complete Control of Simple and Face Diastereoselectivity in the Michael Addition Reactions Between Achiral Equivalents of a Nucleophilic Glycine and (*S*)- or (*R*)-3-(*E*-enoyl)-4-phenyl-1,3-oxazolidin-2-ones: Practical Method for Preparation of Beta-Substituted Pyroglutamic Acids and Prolines. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4984-4990.
42. a) Wang, Q.; Sasaki, N. A.; Potier, P. Asymmetric Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15759-15780. b) Krapcho, J.; Turk, C.; Cushman, D. W.; Powell, J. R.; DeForrest, J. M.; Spitzmiller, E. R.; Karanewsky, D. S.; Duggan, M.; Rovnyak, G. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. Mercaptan, Carboxyalkyl Dipeptide, and Phosphinic Acid Inhibitors Incorporating 4-Substituted Prolines. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1148-1160. c) Del Valle, J. R.; Goodman, M. Asymmetric Hydrogenations for the Synthesis of Boc-Protected 4-alkylprolinols and Prolines.

- J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3923-3931. d) Daugan, A.; Grondin, P.; Ruault, C.; Le Monnier de Gouvillie, A. C.; Coste, H.; Kirilovsky, J.; Hyafil, F.; Labaudiniere, R. The Discovery of Tadalafil: a Novel and Highly Selective PDE5 Inhibitor. 1: 5,6,11,11a-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,6]pyrido[3,4-*b*]indole-1,3(2*H*)-dione Analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4525-32. e) Bolognese, A.; Correale, G.; Manfra, M.; Lavecchia, A.; Mazzoni, O.; Novellino, E.; La Colla, P.; Sanna, G.; Loddo, R. Antitumor Agents. 3. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Pyridisoquinolindione and Dihydrothienoquinolindione Derivatives with Potent Cytotoxic Activity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 849-858.
43. Algunos ejemplos recientes de tripéptidos: a) Motta, A.; Reches, M.; Pappalardo, L.; Andreotti, G.; Gazit, E. The Preferred Conformation of the Tripeptide Ala-Phe-Ala in Water Is an Inverse γ -Turn: Implications for Protein Folding and Drug Design. *Biochemistry* **2005**, *44*, 14170-14178. b) Eker, F.; Griebenow, K.; Cao, X.; Nafie, L. A. Schweitzer-Stenner, R. Preferred Peptide Backbone Conformations in the Unfolded State Revealed by the Structure Analysis of Alanine-Based (AXA) Tripeptides in Aqueous Solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 10054-10059. c) Eker, F.; Griebenow, K.; Schweitzer-Stenner, R. Stable Conformations of Tripeptides in Aqueous Solution Studied by UV Circular Dichroism Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8178-8185. d) Eker, F.; Cao, X.; Nafie, L.; Schweitzer-Stenner, R. Tripeptides Adopt Stable Structures in Water. A Combined Polarized Visible Raman, FTIR, and VCD Spectroscopy Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14330-14341. e) Schweitzer-Stenner, R.; Eker, F.; Huang, Q.; Griebenow, K. Dihedral Angles of Trialanine in D₂O Determined by Combining FTIR and Polarized Visible Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9628-9633. f) Millet, R.; Goossens, L.; Goossens, J.-F.; Chavatte, P.; Bertrand-Caumont, K.; Houssin, R.; Hémichart, J.-P. Conformation of the Tripeptide Cbz-Pro-Leu-Trp-OBzl(CF₃)₂ Deduced from Two-dimensional ¹H-NMR and Conformational Energy Calculations is Related to its Affinity for NK₁-Receptor. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 323-330.
44. a) Smith, J. A.; Pease, L. G. Reverse Turns in Peptides and Proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1980**, 315-399. b) Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. Turns in Peptides and Proteins. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1-109.
45. a) Milner-White, E. J.; Ross, B. I.; Ismail, R.; Belhadj-Mostefa, K.; Poet, R. One Type of Gamma-Turn, Rather Than the Other Gives Rise to Chain-Reversal in Proteins. *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 777-782. b) Milner-White, E. J. Situations of Gamma-Turns in Proteins. Their

- Relation to Alpha-Helices, Beta-Sheets and Ligand Binding Sites. *J. Mol. Biol.* **1990**, *216*, 385-397.
46. a) Freidenger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks, J. R.; Saperstein, R. Bioactive Conformation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Evidence From a Conformationally Constrained Analogue. *Science* **1980**, *210*, 656-658. b) Freidenger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F. Protected Lactam-Bridged Dipeptides for Use as Conformational Constraints in Peptides. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104-109.
47. La bibliografía sobre miméticos de giros β a lo largo de los últimos 20 años es muy extensa. Además de los capítulos dedicados a este tema en las revisiones incluidas en las referencias 32-34 seleccionamos las revisiones siguientes a) Hölzemann, G. Peptide Conformation Mimetics *Kontakte* **1991**, *1*, 3-11 y *2*, 55-63. b) Hanessian S.; McNaughton-Smith, G.; Lombart, H-G.; Lubell, W. D.; *Tetrahedron* **1997**, *38*, 12789-12854. c) Souers, A. J.; Ellman, A. β -Turn Mimetic Library Synthesis: Scaffolds and Applications. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7431-7448.
48. a) Callahan, J. F.; Bean, J. W.; Burgess, J. L.; Eggleston, D. S.; Hwang, S. M.; Kopple, K. D.; Koster, P. F.; Nichols, A.; Peishoff, C. E.; Samanen, J. M.; Vasko, J. A.; Wong, A.; Huffman, W. F. Design and Synthesis of a C_7 Mimetic for the Predicted γ -Turn Conformation Found in Several Constrained RGD Antagonists. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3970-3972. b) Newlander, K. A.; Callahan, J. F.; Moore, M. L.; Tomaszek, T. A.; Huffman, W. F. A Novel Constrained Reduced-Amide Inhibitor of HIV-1 Protease Derived from the Sequential Incorporation of γ -Turn Mimetics Into a Model Substrate. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2321-2331. c) Callahan, J. F.; Newlander, K. A.; Burgess, J. L.; Eggleston, D. S.; Nichols, A.; Wong, A.; Huffman, W. F. The Use of γ -Turn Mimetics to Define Peptide Secondary Structure. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3479-3488. d) Sato, M.; Lee, J. Y. H.; Nakanishi, H.; Johnson, M. E.; Chrusciel, R. A.; Kahn, M. Design, Synthesis and Conformational Analysis of γ -Turn Peptide Mimetics of Bradykinin *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 999-1006. e) Brickmann, K.; Yuan, Z. Q.; Sethson, I.; Somfai, P.; Kihlberg, J. Synthesis of Conformationally Restricted Mimetics of γ -Turns an Incorporation Into Desmopressin, an Analogue of the Peptide Hormone Vasopressin. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2241-2253. f) Herrero, S.; García-López, M. T.; Latorre, M.; Cenarruzabeitia, E.; Del Río, J.; Herranz, R. 2-Oxopiperazine-Based γ -Turn Conformationally Constrained Peptides: Synthesis of CCK-4 Analogues. *J. Org. Chem.* **2002**, *11*, 3866-3873.

49. Patchett, A. A.; Nargund, R. P. Privileged Structures – An Update. *Ann. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 289-298.
50. a) Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Smythe, M. L. The Combinatorial Synthesis of Bicyclic Privileged Structures or Privileged Substructures. *Chem Rev.* **2003**, *103*, 893-930. b) De Simone, R. W.; Currie, K. S.; Mitchell, S. A.; Darrow, J. W.; Pippin, D. A. Privileged Structures: Applications in Drug Discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, *7*, 473-493. c) Costantino, L.; Barlocco, D. Privileged Structures as Leads in Medicinal Chemistry. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 65-85.
51. Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G. ; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. L.; Lotti, V. J. ; Cerino, D. J.; Chen, T. B.; Kling, P. J.; Kunkel, K. A.; Springer, J. P.; Hirshfield, J. Methods for Drug Discovery: Development of Potent, Selective, Orally Effective Cholecystokinin Antagonists. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235-2246.
52. a) Nilsson, J.; Thorstensson, F.; Kvarnström; Oprea, T.; Samuelsson, B.; Nilsson, I. Solid-Phase Synthesis of Libraries Generated from a 4-Phenyl-2-carboxy-piperazine Scaffold. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 546-553.
53. a) Rübsam, F.; Mazitschek, R.; Giannis, A. Synthesis of Chiral Piperazinones as Versatile Scaffolds for Peptidomimetics. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8481-8487. b) Bergman, J. M.; Abrams, M. T.; David, J. P.; Greenberg, I. B.; Robinson, R. G.; Buser, C. A.; Huber, H. E.; Koblan, K. S.; Kohl, N. E.; Lobell, R. B.; Graham, S. L.; Hartman, G. D.; Williams, T. M.; Dinsmore, C. J. Aryloxy Substituted N-Arylpiperazinones as Dual Inhibitors of Farnesyltransferase and Geranyltransferase-I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1411-1415.
54. Algunos ejemplos de productos naturales complejos derivados de 2,5-dicetopiperazinas ver: a) Cui, C.-B.; Kakeya, H.; Osada, H. Novel Mammalian Cell Cycle Inhibitors, Spirotryprostatin A and B, Produced by *Aspergillus Fumigatus*, which Inhibit Mammalian Cell Cycle at G2/M Phase. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12651-12666. b) Hino, T.; Kawate, T.; Nakagawa, M. A Synthesis of So-Called Fumitremorgin C. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1941-1944.
55. a) Prasad, C. Bioactive Cyclic Dipeptides. *Peptides*, **1995**, *16*, 151-164. b) Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Smythe, M. L. Exploring Privileged Structures: the Combinatorial Synthesis of Cyclic Peptides. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **2002**, *16*, 413-415.
56. a) Goodfellow, V. S.; Laudeman, C. P.; Gerrity, J. I.; Burkard, M.; Strobel, E.; Zuzack, J. S.; McLeod, D. A. Rationally Designed Non-Peptides: Variously Substituted Piperazine Libraries

- for the Discovery of Bradykinin Antagonists and Other G-Protein-Coupled Receptor Ligands *Mol. Divers.* **1996**, *2*, 97-102. b) Lazarus, L. H.; Bryant, S. D.; Cooper, P. S.; Guerrini, R.; Balboni, G.; Salvadori, S. Design of Delta-Opioid Peptide Antagonists for Emerging Drug Applications. *Drug Discovery Today* **1998**, *3*, 284-294. c) Lopez-Rodriguez, M. L.; Morcillo, M. J.; Fernandez, E.; Porras, E.; Orensanz, L.; Beneytez, M. E.; Manzanares, J.; Fuentes, J. A. Synthesis and Structure-Activity Relationships of a New Model of Arylpiperazines. 5. Study of the Physicochemical Influence of the Pharmacophore on 5-HT_{1A}/alpha(1)-Adrenergic Receptor Affinity: Synthesis of a New Derivative With Mixed 5-HT_{1A}/D-2 Antagonist Properties. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 186-197. d) Lopez-Rodriguez, M. L.; Morcillo, M. J.; Fernandez, E.; Benhamu, B.; Tejada, I.; Ayala, D.; Viso, A.; Campillo, M.; Pardo, L.; Delgado, M.; Manzanares, J.; Fuentes, J. A. Synthesis and Structure-Activity Relationships of a New Model of Arylpiperazines. 8. Computational Simulation of Ligand-Receptor Interaction of 5-HT_{1A} Agonists with Selectivity Over Alpha 1-Adrenoceptors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2548-2558. e) Baures, P. W.; Ojala, W. H.; Gleason, W. B.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. Design, Synthesis, X-Ray Analysis, and Dopamine Receptor-Modulating Activity of Mimics of the C5 Hydrogen-Bonded Conformation in the Peptidomimetic 2-Oxo-3(R)-[(2(S)-pyrrolidinylcarbonyl)amino]-1-pyrrolidineacetamide. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3677-3683.
57. a) Funabashi, Y.; Horiguchi, T.; Iinuma, S.; Tanida, S.; Harada, S. TAN-1496-A, TAN-1496-C and TAN-1496-E, Diketopiperazine Antibiotics with Inhibitory Activity Against Mammalian DNA Topoisomerase-I. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1202-1218. b) Loughlin, W. A.; Marshall, R. L.; Carreiro, A.; Elson, K. E. Solution-Phase Combinatorial Synthesis and Evaluation of Piperazine-2,5-Dione Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 91-94.
58. a) Faden, A. I.; Cernak, I.; Fan, L.; Vink, R.; Araldi, G. L.; Ficke, S. T.; Roth, B. L.; Kozikowski, A. P. Novel Diketopiperazine Enhances Motor and Cognitive Recovery After Traumatic Brain Injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2003**, *23*, 3423-3454. b) Faden, A. I.; Knobloch, S. M.; Movsesyan, V. A.; Lea, I. V.; Cernak, I. Novel Neuroprotective Tripeptides and Dipeptides. En Neuroprotective Agents: Seventh International Conference. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1053*, 472-481.
59. Bull, S. D.; Davies, S. G.; Parkin, R. M.; Sanchez-Sancho, F. The Biosynthetic Origin of Diketopiperazines Derived from D-Proline. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1998**, 2313-2320 y referencias allí indicadas.

60. Caballero, E.; Avendaño, C.; Menéndez, J. C. Brief Total Synthesis of The Cell Cycle Inhibitor Tryprostatin B and Related Preparation of Its Alanine Analogue. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6944-6951.
61. Wang, H.; Ganesan, A. The *N*-Acyliminium Pictet-Spengler Condensation as a Multicomponent Combinatorial Reaction on Solid Phase and its Application to the Synthesis of Demethoxyfunitremorgin C Analogues. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1647-1649.
62. Cain, J. P.; Mayorov, A. V.; Cai, M.; Wang, H.; Tan, B.; Chandler, K.; Lee, Y.; Petrov, R. R.; Trivedi, D.; Hruby, V. J. Design, Synthesis and Biological Evaluation of a New Class of Small Molecule Peptidomimetics Targeting the Melanocortin Receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5462-5467.
63. Chan, M. F.; Raju, B. G.; Kois, A.; Varughese, J. I.; Varughese, K. I.; Balaji, V. N. Design and Synthesis of 1,4-Diazabicyclo[4.3.0]nonane Peptidomimetic Endothelin Antagonists. *Heterocycles* **1999**, *51*, 5-8.
64. a) Manetti, D.; Ghelardini, C.; Bartolini, A.; Belluci, C.; Dei, S.; Galeotti, N.; Gualtieri, F.; Romanelli M. N.; Scapecchi, S.; Teodori, E. Design, Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of 1,2-Diazabicyclo[4.3.0]nonan-9-ones as a New Class of Highly Potent Nootropic Agents. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1969-1974. b) Scapecchi, S.; Martini, E.; Manetti, D.; Ghelardini, C.; Martelli, D.; Dei, S.; Galeotti, N.; Guandalini, L.; Romanelli M. N.; Teodori, E. Structure-Activity Studies on Unifiram (DM232) and Sunifiram (DM235), Two Novel and Potent Cognition Enhancing Drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 71-85.
65. Algunos ejemplos menos recientes para tetrapéptidos: a) Takasuka, M.; Fujioka, T.; Iwata, T. Intramolecular Hydrogen Bondings and Conformations of Peptidic HIV-1 Protease Inhibitors Studies by FTIR and CD Spectroscopies. *Vib. Spectrosc.* **2005**, *37*, 11-20. b) Luppi, G.; Lanci, D.; Trigari, V.; Garavelli, M.; Garelli, A.; Tomasini, C. Development and Conformational Analysis of a Pseudoproline-Containing Turn Mimic. *J. Org. Chem.* **2002**, *68*, 1982-1993 y referencias ahí citadas. c) Imperiali, B.; Fisher, S. L.; Moats, R. A.; Prins, T. J. A Conformational Study of Peptides with the General Structure Ac-L-Xaa-Pro-D-Xaa-L-Xaa-NH₂: Spectroscopic Evidence for a Peptide with Significant β -Turn Character in Water and in Dimethyl Sulfoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3182-3188. d) Takahashi, K.; Kang, Y. K.; Némethy, G.; Scheraga, H. A. Low-Energy Conformations of Two Lysine-Containing

- Tetrapeptides of Collagen: Implications for Posttranslational Lysine Hydroxylation. *Biopolymers* **1987**, 26, 1781-1788.
66. Gómez-Morena Caleras, C. *Estructura de Proteínas*. Ed. Ariel Ciencia, Argentina, **2004**, pp. 31-62.
67. Dyson, H. J.; Wright, P. E. Defining Solution Conformations of Small Linear Peptides. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* por Annual Reviews, **1991**, 20, 519-538.
68. a) Vitagliano, L.; Berisio, R.; Mastrangelo, A.; Mazzarella, L.; Zagari, A. Preferred Proline Puckerings in Cis and Trans Groups: Implications for Collagen Stability. *Protein Sci.* **2001**, 10, 2627-2632, y referencias ahí citadas. b) Schmid, F. X.; Mayr, L.; Mücke, M.; Schönbrunner, E. R. Prolyl Isomerases-Role in Protein-Folding. *Adv. Protein Chem.* **1993**, 44, 25-66.
69. Balasubramanian, R.; Lakshminarayanan A. V.; Sabesan, M. N.; Tegoni, G.; Venkatesan, K.; Ramachandran, G. N. Studies on Conformation of Amino Acids .6. Conformation of Proline Ring as Observed in Crystal Structures of Amino Acids and Peptides. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **1971**, 3, 25-33.
70. Kilpatrick, J. E.; Pitzer, K. S.; Spitzer, R. The Thermodynamics and Molecular Structure of Cyclopentane. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 2483-2488.
71. Milner-White, E. J.; Bell, L. H.; MacCallum, P. H. Pyrrolidin Ring Puckering in *Cis* and *Trans*-Proline Residues in Proteins and Polypeptides: Different Puckers Are Favoured in Certain Situations. *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 725-734.
72. Hudáky, I.; Baldón, H. A.; Perczel, A. Peptide Models XXXVIII. Proline Conformers From X-Ray Crystallographic Database and From Ab Initio Computations. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2002**, 582, 233-249.
73. Pal, D.; Chakrabarti, P. *Cis* Peptide Bonds in Proteins: Residues Involved their Conformations, Interactions and Locations. *J. Mol. Biol.* **1999**, 294, 271-288.
74. Sugawara, M.; Tonan, K.; Ikawa, S.-I. Effect of Solvent on the *Cis-Trans* Conformational Equilibrium of a Proline Imide Bond of Short Model Peptides in Solution. *Spectrochim. Acta Part A* **2001**, 57, 1305-1306 y referencias ahí citadas.
75. Taylor, C. M.; Hardré, R.; Edwards, P. J. B.; Park, P. H. Factors Affecting Conformation in Proline-Containing Peptides. *Org. Lett.* **2003**, 5, 4413-4416.

76. Breznik, M.; Grdadolnik, S. G.; Giester, G.; Leban, I.; Kikelj, D. Influence of Chirality of the Preceding Acyl Moiety on the *Cis/Trans* Ratio of the Proline Peptide Bond. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7044-7050.
77. Algunos ejemplos de estudios conformacionales de péptidos: a) Nikiforovich, G. V.; Prakash, O.; Gehrig, C. A.; Hruby, V. J. Conformations of the Dermenkephalin Backbone in DMSO Solution by a New Approach to the Solution Conformations of Flexible Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3399-3406. b) Evans, M. C.; Pradhan, A.; Venkatraman, S.; Ojala, W. H.; Gleason, W. B.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. Synthesis and Dopamine Receptor Modulating Activity of Novel Peptidomimetics of L-Prolyl-L-leucyl-glycinamide Featuring α,α -Disubstituted Amino Acids. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1441-1447. c) Aida, M.; Naito, A.; Saitô, H. Molecular Dynamics Simulation of a Simple Tripeptide, N-Acetyl-Pro-Gly-Phe in the Crystalline States: Distinction of the β -Turn Type I from the Type II Form. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1996**, *388*, 187-200. d) Mok, H. K.; Han, K.-H. NMR Solution Conformation of an Antitoxic Analogue of α -Conotoxin GI: Identification of a Common Nicotinic Acetylcholine Receptor α_1 -Subunit Binding Surface for Small Ligands and α -Conotoxins. *Biochemistry* **1999**, *38*, 11895-11904. e) Cho, J.-H.; Mol, K. H.; Olivera, B. M.; McIntosh, J. M.; Park, K.-H.; Han, K.-H. Nuclear Magnetic Resonance Solution Conformation of α -Conotoxin AulB an $\alpha_3\beta_4$ Subtype-selective Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonist. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8680-8685. f) R. Kaul, Banumathi, S.; Velmurugan, D.; Ravikumar, K.; Rao, R. B.; Balaram, P. Context-Dependent Conformation of Diethylglycine Residues in Peptides. *J. Peptide. Res.* **2000**, *55*, 271-278.
78. HyperchemTM Release 7.52. Copyright © 2002. Distribuido por Hypercube, Inc., Gainesville, FL (USA).
79. a) Wütrich, K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. Ed. Wiley & Sons, Nueva York, **1986**. b) Gómez-Morena Caleras, C. Estructura de Proteínas. Ed. Ariel Ciencia, Argetina, **2004**, pp. 311-332. c) Kessler, H. Conformation and Biological Activity of Cyclic Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512-523.
80. a) Belvisi, L.; Gennari, C.; Mielgo, A.; Potenza, D.; Scolastico, C. Conformational Preferences of Peptides Containing Reverse-Turn Mimetic Bicyclic Lactams: Inverse γ -Turns versus Type-II' β -Turns Insights into β -Hairpin Stability. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 389-400. b) Troganis, A.; Gerothanassis, I. P.; Athanassiou, Z.; Mavromoustakos, T.; Hawkes, G. E.; Sakarellos, C. Thermodynamic Origin of *cis/trans* Isomers of a Proline-Containing β -Turn

- Model Dipeptide in Aqueous Solution: A Combined Variable Temperature ^1H -NMR, Two Dimensional ^1H , ^1H Gradient Enhanced Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY), One-Dimensional Steady-State Intermolecular ^{13}C , ^1H NOE, and Molecular Dynamics Study. *Biopolymers* **2000**, 53, 72-83.
81. Landis, C.; Allured, V. S. Elucidation of Solution Structures by Conformer Population Analysis of NOE Data. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9493-9499.
82. Caliendo, G.; Grieco, P.; Perissutti, E.; Santagada, V.; Saviano, G.; Tancredi, T.; Temussi, P. A. Conformational Analysis of Three NK1 Tripeptide Antagonist: A Proton Nuclear Magnetic Resonance Study. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 594-601.
83. Siemion, I. Z.; Wieland, T.; Pook, K. H. Influence of Distance of Proline Carbonyl from Beta and Gamma Carbon on C-13 Chemical-Shifts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, 14, 702-703.
84. Karplus, M. Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J. Chem. Phys.* **1959**, 30, 11-15.
85. Algunas de las correcciones más significativas realizadas sobre la Ec. de Karplus y ejemplos del estudio de Pro utilizando el concepto de pseudorotación: a) Haasnoot, C. A. G.; De Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. The Relationship Between Proton-Proton NMR Coupling Constants and Substituent Electronegativities-I. *Tetrahedron* **1980**, 36, 2783-2792. b) Haasnoot, C. A. G.; De Leeuw, F. A. A. M.; De Leeuw, H. P. M.; Altona, C. Relationship Between Proton-Proton NMR Coupling Constants and Substituent Electronegativities-III. Conformational Analysis of Proline Rings in Solution Using a Generalized Karplus Equation. *Biopolymers* **1981**, 20, 1211-1245. c) Deber, C. M.; Torchia, D. A.; Blout, E. R. Cyclic Peptides. 1. Cyclo(Tri-L-Prolyl) and Derivatives-Synthesis and Molecular Conformation from Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 4893-4897. d) Pachler, K. G. R. Nuclear Magnetic Resonance Study of Some Alpha-Amino Acids .2. Rotational Isomerism. *Spectrochim. Acta* **1964**, 20, 581-587. e) Pogliani, L.; Ellenberger, M.; Valat, J.; Bellocq, A. M. NMR Investigations of Proline and Its Derivatives-4-Proton Magnetic-Resonance Parameters and Structure of Acetyl-Proline Amide. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **1975**, 7, 345-360 y referencias ahí citadas. f) Bystrov, V. F.; Spin-Spin Coupling and the Conformational States of Peptide Systems. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1976**, 10, 41-82, y referencias ahí citadas. g) Haasnoot, C. A. G.; De Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. Prediction of Anti and

- Gauche Vicinal Proton-Proton Coupling-Constants for Hexapyranose Rings Using a Generalized Karplus Equation. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1980**, *89*, 125-131. h) Referencia 72.
86. Todeschi, N.; Gharbi-Benarous, J.; Acher, F.; Larue, V.; Pin, J.-P.; Bockaert, J.; Azerad, R.; Girault, J.-P. Conformational Analysis of Glutamic Acid Analogues as Probes of Glutamate Receptors using Molecular Modelling and NMR Methods. Comparison with Specific Agonist. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 335-352.
87. a) Alonso de Diego, S. A.; Muñoz, P.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; Martín-Martínez, M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Río, J.; Jimeno, M. L.; García-López, M. T. Analogues of the Neuroprotective Tripeptide Gly-Pro-Glu(GPE). Synthesis and Structure-Activity Relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2279-2283. b) Alonso de Diego, S.A.; Gutiérrez-Rodríguez, M.; Pérez de Vega, M. J.; Casabona, D.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; del Río, J.; Jimeno, M. L.; García-López, M. T. New Gly-Pro-Glu (GPE) Analogues. Expedite Solid-Phase Synthesis and Biological Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1392-1396. c) Alonso de Diego, S. A.; Gutiérrez-Rodríguez, M.; Pérez de Vega, M. J.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; Martín-Martínez, M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; del Río, J.; Jimeno, M. L.; García-López, M. T. The Neuroprotective Activity of GPE Tripeptide Analogues Does not Correlate with Glutamate Receptor Binding Affinity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3396-3340.
88. Yaron, A.; Naider, F. Proline-Dependent Structural and Biological Properties of Peptides and Proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *28*, 31-81.
89. Beausoleil, E.; Lubell, W. D. Steric Effects on the Amide Isomer Equilibrium of Prolyl Peptides. Synthesis and Conformational Analysis of *N*-Acetyl-5-*tert*-Butylproline *N'*-Methylamides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12902-12908.
90. Beausoleil, E.; Sharma, R.; Michnick, S. W.; Lubell, W. D. Alkyl-3-Position Substituents Retard the Isomerization of Prolyl and Hydroxiprolyl Amides in Water. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6572-6578.
91. Haack, T.; Mütter, M. Serine Derived Oxazolidines As Secondary Structure Disrupting, Solubilizing Buildings Blocks in Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1589-1592.
92. Keller, M.; Sager, C.; Dumy, P.; Schutkowski, M.; Fischer, G. S.; Mütter, M. Enhancing the Proline Effect: Pseudo-Prolines for Tailoring *Cis/Trans* Isomerization. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2714-2720.

93. Wittelsberger, A.; Keller, M.; Scarpellino, L.; Patiny, L.; Acha-Orbea, H.; Mütter, M. Pseudoprolines: Targeting a *cis* Conformation in a Mimetic of the gp120 V3 Loop of HIV-1. *Angew. Chem.Int. Ed.* **2000**, *39*, 1111-1115.
94. Dumy, P.; Keller, M.; Ryanm D. E.; Rohwedder, T.; Wöhr; Mütter, M. Pseudoprolines As a Molecular Hinge: Reversible Induction of *Cis* Amide Bonds Into Peptide Backbones. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 918-925.
95. Delaney, N. G.; Madison, V. J. Novel Conformational Distributions of Methylproline Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6635-6641.
96. Cavelier, F.; Marchand, D.; Mbassi, P.; Martinez, J.; Marraud, M. Conformational Studies of Proline-, Thiaproline- and Dimethylsilaproline-Containing Diketopiperazines. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 621-625.
97. An, S. S. A.; Lester, C. C.; Peng, J.-L.; Li, Y.-J.; Rothwarf, D. M.; Welker, E.; Thannhauser, T. W.; Zhang, L. S.; Tam, J. P.; Scheraga, H. A. Retention of the *Cis* Proline Conformation in Tripeptide Fragments of Bovine Pancreatic Ribonuclease A Containing a Non-natural Proline Analogue, 5,5-Dimethylproline. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11558-11566.
98. Xia, Q.; Ganem, B. An Efficient Synthesis of Substituted Prolines by the Selective Reduction and Reductive Cyanation of 2-Pyrrolidones. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1597-1598.
99. Hodges, J. A.; Raines, R. T. Effect of 4-Fluoroproline in the X-Position on the Stability of the Collagen Triple Helix. *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics*, Eds. Chorev, M. & Sawyer, T. K.; **2003**, 472-473, y referencias ahí citadas.
100. Kern, D.; Schutkowski, M.; Drakenberg, T. Rotational Barriers of *Cis/Trans* Isomerization of Proline Analogues and Their Catalysis by Cyclophilin. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8403-8408.
101. a) Avenoza, A.; Cativiela, C.; Busto, J. H.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F. New Synthesis of 7-Azabicyclo[2.2.1]Heptane-1-Carboxylic Acid. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 544-548. b) Agradezco al Prof. Cativiela el haberme proporcionado el AHC para este trabajo.
102. a) Trotter, N. S.; Brimble, M. A.; Harris, P. W. R.; Callis, D. J.; Sieg, F. Synthesis and Neuroprotective Activity of Analogues of Glycyl-L-Prolyl-L-Glutamic Acid (GPE) Modified at the α -Carboxylic Acid. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *15*, 501-517. b) Lai, M. Y. H.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Harris, P. W. R.; Levi, M. S.; Sieg, F. Synthesis and Pharmacological

- Evaluation of Glycine-Modified Analogues of the Neuroprotective Agent Glycyl-L-Prolyl-L-Glutamic Acid (GPE). *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *15*, 533-548.
103. Zikos, C.; Livaniou, E.; Leondiadis, L.; Ferderigos, N.; Ithakissios, D. S.; Evangelatos, G. P. Comparative Evaluation of Four Trityl-Type Amidomethyl Polystyrene Resins in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 419-429.
104. a) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in Solid Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 594-598. b) Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial, Organic and Peptide Chemistry 2003-2004, 2002, Advanced ChemTech Inc. pp. 208.
105. Sakura, N.; Hirose, K.; Hashimoto, T. Properties of N^α,N^{ca}-di-*tert*-butyloxycarbonyl-ω-carbamoyl-α-Amino Acids and Direct Synthesis of Protected Homoglutamic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 3506-3509.
106. Pugnère, M.; Castro, B.; Domergue, N.; Previero, A. Enzymatic Synthesis of Side Chain Benzyl Esters of L-α-Amino Dicarboxylic Acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 1015-1018.
107. Tsukida, T.; Hiramatsu, Y.; Tsujishita, H.; Kiyoi, T.; Yoshida, M.; Kurokawa, K.; Moriyama, H.; Ohmoto, H.; Wada, Y.; Saito, T.; Kondo, H. Studies on Selection Blockers. 5. Design, Synthesis and Biological Profile of Sialyl Lewis x Mimetics Based on Modified Serine-Glutamic Acid Dipeptides. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3534-3541.
108. Wöhr, T.; Wahl, F.; Nefzi, A.; Rohwedder, T.; Sato, T.; Sun, X.; Mütter, M. Pseudo-Prolines as a Solubilizing, Structure Disrupting Protection Technique in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218-9227.
109. a) Lewis, N. J.; Inloes, R. L.; Hes, J.; Matthews, R. H.; Milo, G. Synthetic Sulfur-Containing Aminoacids. Inhibition of Transport Systems in S37 Ascites Tumor Cells. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1070-1073. b) Kemp, D. S.; Carey, R. I. Boc-L-Dmt-OH as a Fully N,S-Blocked Cysteine Derivatives for Peptide Synthesis by Prior Thiol Capture. Facile Conversion of N-Terminal Boc-L-Dmt-Peptides to H-Cys(Scm)-Peptides. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3640-3646.
110. a) Foster, A. C.; Fagg, G. E. Comparison of L-[³H]-Glutamate, D-[³H]-Aspartate, DL-[³H]-AP5 and [³H]-NMDA as Ligands for NMDA Receptors in Crude Postsynaptic Densities from Rat Brain. *Eur. J. Pharmacol.* **1987**, *113*, 291-300. b) Monahan, J. B.; Michel, J. Identification and Characterization of an N-Methyl-D-Aspartate-Specific L-[³H]-Glutamate Recognition Site in Synaptic Plasma Membranes. *J. Neurochem.* **1987**, *48*, 1699-1708.

111. Bräuner-Osborne, H.; Egebjerg, J.; Nielsen, E. O.; Madsen, U.; Krogsgaard-Larsen, P. Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2609-2645 y referencias ahí citadas.
112. Tikhonova, I. G.; Baskin, I. I.; Palyulin, V. A.; Zefirov, N. S.; Bachurin, S. O. Structural Basis for Understanding Structure-Activity Relationships for the Glutamate Binding Site of the NMDA Receptor. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3836-3843 y referencias ahí citadas.
113. Ornstein, P. L.; Klimkowski, V. J. In *Excitatory Amino Acid Receptors: Design of Agonist and Antagonist*; Krogsgaard-Larsen, P.; Hansen, J. J., Eds.; Ellis Horwood: Chichester, **1992**, pp. 183-200.
114. Snider, B.J.; Moss, J. L.; Revilla, F. J.; Lee, C. S.; Wheeler, V. C.; MacDonald, M. E.; Choi, D. W. Neocortical Neurons Cultured From Mice With Expanded Cag Repeats in the Huntingtin Gene: Unaltered Vulnerability to Excitotoxins and Other Insults. *Neuroscience* **2003**, *120*, 617-625.
115. De Cristóbal, J.; Cárdenas, A.; Lizasoain, I.; Leza, J. C.; Fernández-Tomé, P.; Lorenzo, P.; Moro, M. A. Inhibition of Glutamate Release Via Recovery of ATP Levels Accounts for a Neuroprotective Effect of Aspirin in Rat Cortical Neurons Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation. *Stroke* **2002**, *33*, 261-271.
116. Ejemplos de utilización del enlace metilnamino: a) Rodríguez, M.; Lignon, M. F.; Galas, M. C.; Fulcrand, P.; Mendre, C.; Aumelas, A.; Laur, J.; Martinez, J. Synthesis and Biological Activities of Pseudopeptide Analogues of the C-Terminal Heptapeptide of Cholecystokinin. On the Importance of the Peptide Bonds. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1366-1373. b) Shiosaki, K.; Lin, C. W.; Leanna, M. R.; Morton, H. E.; Miller, T. R.; Witte, D.; Stashko, M.; Nadzan, A. M. Toward Developing Peptidomimetics: Successful Replacement of Backbone Amide Bonds in Tetrapeptide-Based CCK-A Receptor Agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 855-860. c) Rodriguez, M.; Lin, C. W.; Leanna, M. R.; Morton, H. E.; Miller, T. R.; Witte, D.; Stashko, M.; Nadzan, A. M. Synthesis of Pseudopeptide Analogues of the C-Terminal Tetrapeptide of Gastrin and Evaluation of Their Biological Activity on Acid Secretion. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1986**, *27*, 293-299. d) Martinez, J.; Bali, J. P.; Rodríguez, M.; Castro, B.; Magous, R.; Laur, J.; Lignon, M. F. Synthesis and Biological Activities of Some Pseudopeptide Analogues of Tetragastrin: The Importance of the Peptide Backbone. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1874-1879. e) Sasaki, Y.; Murphy, W. A.; Heiman, V. L.; Lance, V. A.; Coy, D. H. Solid-Phase Synthesis of Biological Properties of $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ Pseudopeptide Analogues

- of a Highly Potent Somastotin Octapeptide. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1162-1166. f) Vavrek, R. J.; Gera, L.; Stewart, J. M. Bradykinin Analogs with Reduced Peptide Bonds at the Ser-Pro Position: Potent Agonist Analogs. En *Peptides 1990*, Giralt, E.; Andrew, D. Eds.; ESCOM: Leiden, **1991**, pp. 642-643. g) Hocart, S. J.; Nekola, M. V.; Coy, D. H. Effect of the CH₂NH and CH₂NAc Peptide Bond Isosteres on the Antagonistic and Histamine Releasing Activities of a Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1820-1824. h) Jensen, R. T.; Coy, D. H. Progress on the Development of Potent Bombesin Receptor Antagonist. *Trends in Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 13-19. i) Harbeson, S. L.; Shatzer, S. A.; Le, T. B.; Buck, S. H. A New Class of High Affinity Ligands for the Neurokinin A NK₂ Receptor: Ψ[CH₂NR] Reduced Peptide Bond Analogues of Neurokinin A₄₋₁₀. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3949-3955.
117. Kaltenbronn, J. S.; Hudspeth, J. P.; Lunney, E. A.; Michniewicz, B. M.; Nicolaidis, E. D.; Repine, J. T.; Roark, W. H.; Stier, M. A.; Tinney, F. J.; Woo, P. K. W.; Essemburg, A. D. Renin Inhibitors Containing Isosteric Replacements of the Amide Bond Connecting the P₃ and P₂ Sites. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 838-845.
118. Cushman, M.; Oh, Y.; Copeland, T. D.; Orozslan, S.; Snyder, S. W. Development of Methodology for the Synthesis of Stereochemically Pure PheΨ[CH₂N]Pro Linkages in HIV Protease Inhibitors. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4161-4167.
119. Spatola, A. F. Peptide Backbone Modifications: A Structure-Activity Analysis of Peptides Containing Amide Bond Surrogates, Conformational Constraints, and Related Backbone Replacements. en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, vol. 7, Weinstein, B. Ed.; Marcel Dekker: Nueva York, **1983**, pp. 267-357.
120. Fincham, C. I.; Higginbottom, M.; Hill, D. R.; Horwell, D. C.; O'Toole, J. C.; Ratcliffe, G. S.; Rees, D. C.; Roberts, E. Amide Bonds Replacements Incorporated Into CCK-B Selective Dipeptoids. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1472-1484.
121. Herranz, R.; Suárez-Gea, M. L.; Vinuesa, S.; García-López M. T.; Martínez, A. Synthesis of Ψ[CH(CN)NH] Pseudopeptides. A New Peptide Bond Surrogate. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7579-7582.
122. Herranz, R.; Suárez-Gea, M. L.; Vinuesa, S.; García-López, M. T. Studies on the Synthesis of Cyanomethyleneamino Pseudopeptides. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5186-5191.
123. González-Muñiz, R.; García-López, M. T.; Gómez-Monterrey, I.; Herranz, R.; Jimeno, M. L.; Suárez-Gea, M. L.; Johansen, N. L.; Madsen, K.; Thøgersen, H.; Suzdak, P. Ketomethylene

- and (Cyanomethylene)amino Pseudopeptide Analogues of the C-Terminal Hexapeptide of Neurotensin. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1015-1021.
124. Herrero, S.; Suárez-Gea, M. L.; González-Muñiz, R.; García-López, M. T.; Herranz, R.; Ballaz, S.; Barber, A.; Fortuño, A.; Del Río, J. Pseudopeptide CCK-4 Analogues Incorporating the $\Psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ Peptide Bond Surrogate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 855-860.
125. Bartolomé-Nebreda, J. M.; Gómez-Monterrey, I.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M.; Ballaz, S.; Cenarruzabeitia, E.; Latorre, M.; Del Río, J.; Herranz, R. 5-(Tryptophyl)amino-1,3-dioxoperhydropyrido[1,2-*c*]pyrimidine-Base Potent and Selective CCK₁ Receptor Antagonists: Structural Modifications at the Tryptophan Domain. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4659-4668.
126. Kim, S.; Ho Oh, C.; Suk Ko, J.; Han Ahn, K.; Jin Kim, Y. Zinc-Modified Cyanoborohydride as a Selective Reducing Agent. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 1927-1932.
127. Fehrentz, J. A.; Castro, B. An Efficient Synthesis of Optically Active α -(*t*-Butoxycarbonylamino)-aldehydes from α -Amino Acids. *Synthesis* **1983**, 676-678.
128. Daly, W. H.; Poché, D. The Preparation of N-Carboxyanhydrides of α -Amino Acids Using Bis(trichloromethyl)carbonate. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5859-5862.
129. Davidsen, S. K.; Chu-Moyer, M. Y. Synthesis of Stereochemically Defined $\Psi[\text{CH}(\text{alkyl})\text{NH}]$ Pseudopeptides. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5558-5567.
130. Mohan, R.; Chou, Y. L.; Bihovsky, R.; Lumma, W. C.; Erhardt, P. W.; Shaw, K. J. Synthesis and Biological Activity of Angiotensin II Analog Containing a Val-His Replacement, Val $\Psi[\text{CH}(\text{CONH}_2)\text{NH}]\text{His}$. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2402-2410.
131. Suárez-Gea, M. L.; García-López, M. T.; Herranz, R. A General Method for the Synthesis of (carbamoylmethylene)amino Pseudopeptides. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3600-3603.
132. Suárez-Gea, M. L.; García-López, M. T.; González Muñiz, R.; Herrero, S.; Herranz, R. Branched Peptides and Conformationally constrained analogues from cyanomethyleneamino pseudopeptides. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 2083-2084.
133. Herrero, S.; Salgado, A.; García-López, M. T.; Herranz, R. Synthesis of Chiral 1,6,8-trioxoperhydropyrazino[1,2-*c*]pyrimidines As Novel Highly Functionalized Scaffolds for Peptidomimetics. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4899-4902.

134. Lukina, T. V.; Sviridov, S. I.; Shorshnev, S. V.; Aleksandrov, G. G.; Stepanov, A. E. Novel Approach to the Synthesis of Perhydropyrazino[1,2-*a*]pyrazine Derivatives from Amino Alcohols. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 51-54.
135. Maison, W.; Küntzer, D.; Grohs, D. Short and Efficient Synthesis of Diazabicycloalkane Dipeptide Mimics. *Synlett* **2002**, 1795-1798.
136. Golebiowski, A.; Klopfenstein, S. R.; Chen, J. J. C.; Shao, X. Solid Supported High-Throughput Organic Synthesis of Peptide β -Turn Mimetics Via Petasis Reaction/Diketopiperazine Formation. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4841-4844.
137. Freed, M. E.; Day, A. R. Syntheses of 1,4-Diazabicyclo[4.4.0]decanes, 1,4-Diazabicyclo[4.3.0]nonanes and 1,8-Diazabicyclo[4.3.0]nonanes. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 2108-2113.
138. Maison, W.; Grohs, D. C.; Prenzel, A. H. G. P. Efficient Synthesis of Structurally Diverse Diazabicycloalkanes: Scaffolds for Modular Peptide Mimetics with Tunable Backbone Conformations. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1527-1543.
139. Martín-Martínez, M.; Herranz, R.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. Bicyclic Lactams as Templates for Peptidomimetics. Studies on Stereoselective Synthetic Route to 6-Oxoperhydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazines. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13991-14004.
140. a) Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; Herranz, R.; González-Muñiz, R. 3,6-Dioxoperhydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazines as Templates for Peptidomimetics. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10361-10374. b) Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; Herranz, R.; González-Muñiz, R. Studies on the Synthesis of Substituted 3,6-Dioxoperhydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazines as Non-Peptide Scaffolds for Peptidomimetics. *Heterocycles* **1997**, *45*, 1723-1731.
141. Pons, J.-F.; Fauchère, J.-L.; Lamaty, F.; Molla, A.; Lazaro, R. A. Constrained Diketopiperazine as a New Scaffold for the Synthesis of Peptidemimetics. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 853-859.
142. Singh, S. B.; Tomassini, J. E. Synthesis of Natural Flutimide and Analogous Fully Substituted Pyrazine-2,6-diones, Endonuclease Inhibitors of Influenza Virus. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5504-5516.
143. Threadgill, M. D.; Gledhill, A.P. Synthesis of Peptides Containing *S*-(*N*-Alkylcarbamoyl)cysteine Residues, Metabolites of *N*-Alkylformamides in Rodents and in Humans. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2940-2949.

144. Fischer, P. M. Diketopiperazines in Peptide and Combinatorial Chemistry. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 9-35.
145. a) de Costa, B. R.; He, X.-S.; Linders, J. T. M.; Dominguez, C.; Gu, Z. Q.; Williams, W.; Bowen, W. D. Synthesis and Evaluation of Conformationally Restricted *N*-[2-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]-*N*-methyl-2-(1-pyrrolidinyl)ethylamines at σ Receptors. 2. Piperazines, Bicyclic Amines, Bridged Bicyclic Amines, and Miscellaneous Compounds. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2311-2320. b) Este compuesto fue descrito inicialmente sin caracterizar en: Bláha, K.; Buděšínský, M.; Frič, I.; Smolíková, J.; Vičar, J. Spectroscopic Studies of Cyclodipeptides Containing Pipecolic Acid, Proline and/or 2-Azetidinecarbocyclic Acid. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *15*, 1437-1440.
146. Este compuesto fue sintetizado originalmente por: Freed *et al.* (ref. 137) mediante reacción entre H-Pro-OEt y aziridina con un 30% de rendimiento.
147. Achmatowicz, M.; Jurczak, J. The Synthesis of L-Proline Derived Tetraazamacrocyclic ligands of C_2 Symmetry Via Intramolecular Ester Aminolysis. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 111-119.
148. Durante la redacción de esta Memoria ha aparecido descrita la preparación de Boc-D-ProΨ[CH₂NH]Gly-OMe y ciclo(D-ProΨ[CH₂NH]Gly), enantiómeros de **187** y **189** respectivamente. El segundo de estos compuestos forma parte como sustituyente de estructuras finales derivadas de piridina. Alvaro, G.; Andreotti, D.; Belvedere, S.; Di Fabio, R.; Falchi, A.; Giovanni, R. Pyridine Derivatives and Their Use in the Treatment of Psychotic Disorders. WO 2007/028654.
149. gNMR V4.0 por Budzelaar, P. H. M. Copyright © 1995-1997. Ivorysoft. Distribuido por Cherwell Scientific Publishing. Oxford (UK).
150. Rogachevskii, I. V.; Shchegolev, B. F.; Krylov, B. V. Simulation of Molecular Dynamics of the Tetrapeptide Ala-Gly-Asp-Pro. *Russ. Jour. Gen. Chem.* **2004**, *74*, 235-238.
151. Osby, J. O.; Ganem, B. Rapid and Efficient Reduction of Aliphatic Nitro Compounds to Amines. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 6413-6416.
152. Yokokawa, F.; Sameshima, H.; In, Y.; Minoura, K.; Ishida, T.; Shioiri, T. Total Synthesis and Conformational Studies of Ceratospongamide, a Bioactive Cyclic Heptapeptide from Marine Origin. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8127-8143.

153. Blaney, P.; Grigg, R.; Rankovic, Z.; Thornton-Pett, M.; Xu, J. Fused and Bridged bi- and tri-Cyclic Lactams Via Sequential Metallo-Azomethine Ylide Cycloaddition-Lactamisation. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1719-1737.
154. Bischofberger, N.; Waldman, H.; Saito, T.; Simon, E. S.; Lees, W.; Bednarski, M. D.; Whitesides, G. M. Synthesis of Analogues of 1,3-Dihydroxyacetone Phosphate and Glyceraldehyde 3-Phosphate for Use in Studies of Fructose-1,6-diphosphate Aldolase. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3457-3465.
155. Descrito sin caracterizar en: Joucla, M.; El Goumzili, M. Reactions of Schiff Bases Anions UIT α,ω -Dihaloalkanes: Synthetic Route to Cyclic α -Aminoacid Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1681-1684.
156. Descrito sin caracterizar en: Magaard, V. W.; Sánchez, R. M.; Bean, J. W.; Moore, M. L. A Convenient Synthesis of the Conformationally Constrained Amino Acid 5,5-Dimethylproline. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 381-384.
157. Este compuesto ha sido descrito previamente en la literatura sintetizado por lactamización a partir del dipéptido Z-Gly-P^{Me}-OMe en: Brimble, M. A.; Guan, J.; Sieg, F. Neuroprotective Bicyclic Compounds and Methods for Their Use. PCT Int. Appl. WO 2005/023815.

Tabla 5.4. Datos espectroscópicos más característicos de los tripéptidos protegidos **77-82** y **85** de fórmula general Gly-Pro-AA₃.

	77	78	79	80	81	82	85
AA ₃	Asp	D-Asp	D-Glu	Hgl	D-Hgl	Glu-NHMe	Glu-NHMe ^d
¹ H-RMN ^{a,b}							
Gly							
NH	5.67 (m)	5.62 (m)	5.68 (m)	5.84 (m)	5.72 (m)	5.68 (m)	6.39 (m)
H _α	4.02 y 3.87 (ABX, -17.2, 4.8, 3.9)	4.97 y 3.83 (ABX, -17.2, 5.1, 3.9)	4.00 y 3.90 (ABX, -17.2, 4.9, 4.1)	4.07 y 3.92 (ABX, -17.1, 5.4, 3.9)	4.01 y 3.83 (ABX, -17.2, 5.0, 3.8)	4.11 y 3.92 (ABX, -16.9, 5.0, 4.5)	4.13 y 3.98 (ABX, -17.3, 4.8, 4.1)
Pro							
H _α	4.50 (dd, 7.9, 2.2)	4.53 (dd, 8.1, 1.7)	4.59 (m)	4.58 (m)	4.60 (d, 7.8, 1.1)	4.39 (m)	4.47 (dd, 7.6, 4.6)
H _δ	3.38 y 3.35 (m)	3.38-3.26 (m)	3.40 y 3.32 (m)	3.51 y 3.36 (m)	3.47-3.28 (m)	3.69 y 3.47 (m)	3.68 (dt, 9.8, 5.9) y 3.47 (dt, 9.8, 7.8)
AA₃							
NH	7.32 (m)	7.58 (d, 8.4)	7.54 (d, 7.7)	7.33 (m)	7.35 (m)	7.67 (d, 8.1) / 6.88 (m) ^c	7.60 (d, 7.6) / 6.67 (m) ^c
H _α	4.85 (dt, 8.4, 4.8)	4.86 (m)	4.58 (m)	4.53 (m)	4.53 (m)	4.45 (m)	4.42 (m)
H _β	3.04 y 2.90 (ABX, -16.9, 4.8, 4.8)	3.04 y 2.84 (ABX, -17.0, 4.8, 4.8)	2.21 y 2.04 (m)	1.89 y 1.70 (m)	1.88 y 1.69 (m)	2.19-2.06 (m)	2.19-2.06 (m)
H _γ			2.46-2.37 (m)	1.64-1.57 (m)	1.69-1.62 (m)	2.53-2.45 (m)	2.57 (dt, 17.6, 7.1)
H _δ				2.31 (t, 6.8)	2.38-2.31 (m)		
¹³ C-RMN ^a							
Gly							
CO _α	167.8	168.2	168.4	168.3	168.4	169.5	169.1
C _α	43.3	43.3	43.4	43.4	43.3	43.5	43.5
Pro							
CO _α	170.7	170.5	170.8	170.6	170.7	171.1	171.2
C _α	60.0	60.0	60.1	59.9	60.0	61.3	61.3
AA₃							
CO _α / CO _γ	170.2 / 170.6	170.2 / 170.4	173.0 / 171.2	171.6 / 173.0	171.5 / 173.0	171.0 / 174.7	171.4 / 174.5
C _α	48.8	48.7	52.0	52.0	52.1	53.0	53.1
C _β	36.1	36.2	26.4	31.2	31.0	26.0	25.9
C _γ			30.2	20.4	20.4	30.6	30.7
C _δ				33.2	33.3		





a) Espectros realizados en muestras disueltas en CDCl₃ a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. b) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). c) Desplazamiento químico para el NHMe. d) Fórmula general Ac-Gly-Pro-Glu(OBn)-NHMe.

Tabla 5.6. Datos espectroscópicos más característicos de los tripéptidos desprotegidos **23-29** de fórmula general Gly-Pro-AA₃.

	23	24	25	26	27	28	29
AA ₃	Asp	D-Asp	D-Glu	Hgl	D-Hgl	Glu-NHMe	Glu-NHMe ^d
¹ H-RMN ^{a, b}							
Gly							
H _α	3.85 y 3.79 (AB, -16.8)	3.84 y 3.79 (AB, -17.0)	3.82 y 3.77 (AB, -16.6)	3.77 y 3.73 (AB, -16.5)	3.81 y 3.77 (AB, -16.7)	3.84 y 3.77 (AB, -16.5)	3.92 y 3.88 (ABX, -17.6, 5.9 y 5.4)
Pro							
H _α	4.32 (m)	4.33 (dd, 8.5, 4.1)	4.29 (dd, 8.3, 3.8)	4.25 (dd, 8.3, 3.9)	4.31 (d, 9.8, 4.4)	4.25 (dd, 8.7, 4.5)	4.22 (dd, 8.6, 4.9)
H _δ	3.44 y 3.37 (m)	3.44 y 3.37 (m)	3.42 y 3.35 (m)	3.41 y 3.26 (m)	3.47-3.31 (m)	3.43-3.33 (m)	3.52-3.39 (m)
AA₃							
NH	8.06 (d, 7.8)	8.11 (d, 8.1)	8.02 (d, 7.8)	7.92 (d, 7.3)	7.96 (d, 7.8)	8.51 (d, 6.2) / 7.70 (m) ^c	8.33 (d, 6.8) / 7.60 (m) ^c
H _α	4.35 (m)	4.40 (m)	4.06 (m)	3.95 (ddd, 8.4, 7.3, 4.8)	4.04 (m)	4.01 (m)	4.06 (ddd, 9.3, 6.8 y 5.4)
H _β	2.68 y 2.60 (ABX, -16.3, 7.1, 4.9)	2.68 y 2.57 (ABX, -16.3, 7.5, 5.0)	1.93 y 1.74 (m)	1.59 y 1.47 (m)	1.63 y 1.50 (m)	1.85-1.73 (m)	1.89 y 1.77 (m)
H _γ			2.18 (t, 7.6)	1.38 (m)	1.38 (m)	2.13-2.05 (m)	2.25-2.14 (m)
H _δ				2.13 (t, 7.0)	2.13 (t, 8.1)		
¹³ C-RMN ^a							
Gly							
CO _α	166.0	166.2	166.2	165.8	166.0	166.3	170.1
C _α	40.0	41.1	41.1	40.8	40.9	40.8	42.1
Pro							
CO _α	173.5	173.5	173.7	173.6	173.5	174.3	174.9
C _α	60.8	61.1	61.1	60.7	60.9	60.8	61.4
AA₃							
CO _α / CO _γ	176.2 / 176.5	176.3 / 176.5	177.4 / 178.9	178.1 / 179.7	178.2 / 179.7	174.1 / 181.0	174.9 / 179.3
C _α	51.5	51.6	54.5	54.9	54.7	54.4	53.9
C _β	37.4	38.0	27.3	31.0	31.3	27.1	26.9
C _γ			31.5	21.3	21.3	32.9	31.4
C _δ				34.3	34.4		

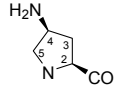
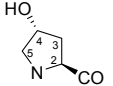
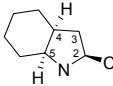
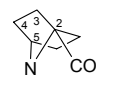
a) Espectros realizados en muestras disueltas en H₂O/D₂O a 500 MHz para ¹H-RMN y 125 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. b) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). c) Desplazamiento químico para el NHMe. d) Fórmula general Ac-Gly-Pro-Glu-NHMe.

Tabla 5.9. Datos espectroscópicos más significativos de los tripéptidos desprotegidos **30-37** de fórmula general Gly-AA₂-Glu.

AA ₂	30	31	32		33	
						
¹ H-RMN ^{a, b, c}			<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>
Gly-H _α	3.66 (s)	3.65 (s)	3.89 (s)		3.57 y 3.43 (AB, -16.4)	
AA ₂						
NH	8.73 (s)	8.06 (s)				
H ₂	1.30 (m)	1.80 y 1.55 (m)	4.89 (dd, 6.2, 2.5)		4.89 (dd, 9.7, 5.8)	
H ₃	0.98 (m)	1.38 y 1.02 (m)	1.51 y 1.31 (m)		2.59 y 2.14 (m)	
H ₄		1.38 y 1.17 (m)	1.96 y 1.55 (m)		3.88-3.81 (m)	
H ₅			1.50 y 1.18 (m)			
H ₆			3.41 y 3.06 (m)			
Glu						
NH	7.97 (d, 7.3)	7.80 (d, 7.8)	8.13 (d, 7.2)		8.47 (d, 7.6)	
H _α	4.23 (ddd, 9.4, 7.3, 4.6)	4.19 (ddd, 9.9, 7.8, 4.8)	4.20 (ddd; 9.4, 7.2, 5.2)		4.27 (ddd, 9.0, 7.4, 5.1)	
H _β	2.03 y 1.83 (m)	1.97 y 1.74 (m)	2.0 y 1.82 (m)		2.04 y 1.84 (m)	
H _γ	2.29 (t, 6.9)	2.24 (t, 7.2)	2.29 (t, 7.1)		2.32 (t, 7.1)	
¹³ C-RMN ^a						
Gly-C _α	40.8	40.6	41.3	40.7	38.7	38.5
AA ₂						
C ₁	34.4	60.4				
C ₂	16.9	31.6	56.5	53.9	62.7	61.4
C ₃	16.9	24.6	24.0	24.2	21.8	20.9
C ₄		20.9	26.8	26.5	47.5	48.9
C ₅			20.1	19.7		
C ₆			40.4	43.5		
Glu						
C _α	52.9	52.3	53.1	52.8	52.8	52.7
C _β	25.4	25.5	25.6	25.7	26.2	26.2
C _γ	30.3	30.2	30.7	30.5	30.6	30.3

a) Espectros realizados en muestras disueltas en H₂O/D₂O a 500 MHz para ¹H-RMN y 125 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. b) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). c) En los casos que se da sólo una señal, ésta corresponde al rotámero mayoritario, *trans*.

Tabla 5.9. Datos espectroscópicos más significativos de los tripéptidos desprotegidos **30-37** de fórmula general Gly-AA₂-Glu (Continuación).

	34		35		36		37	
AA ₂								
	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>
¹ H-RMN ^{a, b, c}								
H _α Gly	3.79 y 3.73 (AB, -16.6)		3.72 y 3.45 (AB, -16.1)		3.86 y 3.70 (AB, -16.5)		3.83 (s)	
AA ₂								
H ₂	4.39 (dd, 9.4, 3.4)		4.42 (m)		4.24 (t, 9.0)			
H ₃	2.51(ddd, 14.5, 9.4, 6.5) y 1.94 (m)		2.18 y 1.86 (m)		2.00 y 1.76 (m)		1.88 y 1.74 (m)	
H ₄	3.92 (m)		4.41 (m)		2.21 (m)		1.78 y 1.52 (m)	
H ₅	3.73 (dd, 11.8, 5.9) y 3.57 (dd, 11.8, 2.8)		3.58 (d, 12.7) y 3.36 (dd, 12.7, 4.2)		3.55 (dd, 11.4, 4.0) y 3.36 (d, 11.4)		3.66 (m)	
Glu								
NH	8.94 (d, 7.3)	8.76 (d, 7.3)	8.54 (d, 8.3)	8.47 (d, 7.3)	8.47 (d, 7.6)	8.36 (d, 7.6)	8.12 (d, 7.6)	7.95 (d, 7.4)
H _α	4.14 (m)	4.19 (ddd, 9.2, 7.3, 4.9)	4.23 (ddd, 9.1, 7.3, 5.1)		4.23 (m)		4.28 (ddd, 9.8, 7.6, 4.9)	4.36 (ddd, 9.5, 7.4, 4.9)
H _β	1.99 y 1.76 (m)		2.03 y 1.79 (m)		2.02 y 1.79 (m)		2.03 y 1.82 (m)	
H _γ	2.28 (t, 7.2)		2.25 (t, 7.1)		2.32 (t, 7.4)		2.42-2.35 (m)	2.35 (t, 7.3)
¹³ C-RMN ^{a, c}								
C _α Gly	40.2	40.5	40.0	40.5	39.9	40.3	40.4	
AA ₂								
C ₂	58.2	59.2	58.4	59.1	59.9	60.5	70.0	69.9
C ₃	34.7	32.3	39.6	37.2	30.5		34.1	
C ₄	51.1	50.2	68.0	69.7	37.0		28.1	
C ₅	48.2	50.0	54.9	54.4	59.0	58.2	59.9	59.8
Glu								
C _α	52.8	52.4	52.7	52.4	52.3		52.8	
C _β	25.2	25.8	25.4	26.0	26.0		26.0	
C _γ	30.6	29.9	30.4	30.0	30.1		30.0	

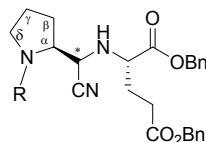
a) Espectros realizados en muestras disueltas en H₂O/D₂O a 500 MHz para ¹H-RMN y 125 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. b) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). c) En los casos que se da sólo una señal, ésta corresponde al rotámero mayoritario, *trans*.

Tabla 5.10. Datos espectroscópicos más característicos de los tripéptidos protegidos de fórmula general Gly-AA₂-Glu, **112**, **115**, **118**, **125**, **126**, **131** y **132**.

	112	115	118	125	126	131	132
AA ₂	dmT	Thz	p ^{Me}	dmP	D-dmP	D-Pro	D-Pro ^c
¹ H-RMN ^{a,b}							
Gly							
NH	5.31 (m)	5.44 (m)	5.69 (m)	5.55 (m)	5.61 (m)	5.72 (m)	5.79 (m)
H _α	3.90 y 3.78 (ABX, -16.8, 5.6, 2.7)	4.09 y 4.00 (ABX, -17.2, 4.8, 4.3)	4.01 y 3.90 (ABX, -17.1, 5.1, 3.7)	3.85 y 3.68 (ABX, -16.9, 5.5, 3.5)	3.87 y 3.71 (ABX, -16.9, 4.9, 4.9)	3.99 y 3.89 (ABX, -17.2, 4.8, 4.2)	4.01 y 3.90 (ABX, -17.2, 4.9, 4.0)
AA₂							
H _α	4.64 (m)	4.99 (dd, 6.8, 3.3)	1.64 (s) ^e	4.25 (d, 8.3)	4.27 (d, 7.8)	4.57 (m)	4.51 (m)
H _β	3.33 (m)	3.44 (dd, 11.4, 3.3), 3.13 (dd, 11.4, 6.8)	2.47 y 172 (m)	2.21 y 2.08 (m)	2.17 y 2.09 (m)	2.34-2.23 (m)	2.21 y 2.03 (m)
H _γ			1.96-1.87 (m)	1.78 y 1.70 (m)	1.81 y 1.65 (m)	2.03-1.81 (m)	2.44-2.37 (m)
H _δ	1.96 y 1.82 (s) ^d	4.41 y 4.38 (AB, 8.4)	3.56-3.41 (m)	1.64 y 1.40 (s) ^d	1.67 y 1.40 (s) ^d	3.45-3.25 (m)	3.48 y 3.34 (m)
Glu							
NH	7.13 (d, 6.7)	7.13 (d, 7.1)	7.54 (d, 7.7)	7.00 (d, 7.6)	7.12 (d, 7.6)	7.54 (d, 7.8)	7.30 (m)
H _α	4.46 (m)	4.40 (m)	4.56 (m)	4.59 (m)	4.63 (m)	4.60 (m)	4.58 (m)
¹³ C-RMN ^a							
Gly							
CO _α	167.5	167.9	167.3	167.3	167.4	168.3	167.9
C _α	44.6	43.3	43.8	44.2	44.1	43.3	43.3
AA₂							
CO _α	169.2	168.8	171.4	171.1	171.1	170.8	170.9
C _α	66.1	62.6	68.2	62.4	62.2	60.0	60.0
C _β	32.4	32.2	38.3	28.9	28.9	27.8	26.8
C _γ			23.3	39.5	39.0	24.5	24.7
C _δ	74.5	48.2	47.5	64.8	64.8	46.1	46.1
Glu							
CO _α / CO _γ	170.2 / 172.1	170.5 / 172.6	172.9 / 173.4	171.5 / 172.7	171.4 / 173.0	171.2 / 173.0	171.3 / 172.6
C _α	52.6	52.6	52.1	52.4	53.0	51.9	51.7

a) Espectros realizados en muestras disueltas en CDCl₃ a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. b) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). c) Fórmula general de **132**: Gly-D-Pro-D-Glu. d) Desplazamiento químico para los Me en posición δ. e) Desplazamiento químico para el Me en posición α.

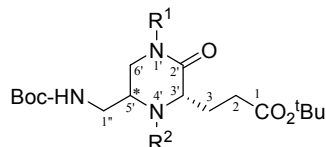
Tabla 5.14. Datos analíticos y espectroscópicos más característicos de (*R*)-, (*S*)-**147**, (*R*)-, (*S*)-**148** y (*R*)-, (*S*)-**150**.



	(<i>R</i>)- 147	(<i>S</i>)- 147	(<i>R</i>)- 148	(<i>S</i>)- 148	(<i>R</i>)- 150	(<i>S</i>)- 150
R	Boc	Boc	H	H	Z-Gly	Z-Gly
Rdto. (%)	51	28	89	94	22	29
P.f. (°C)	81-83 ^c	Aceite	Sirupe	Espuma	Aceite	Aceite
$[\alpha]_D^{20}$	-40.7 (c 1, CHCl ₃)	-73.6 (c 1, CHCl ₃)	-34.7 (c 1, CHCl ₃)	-50.2 (c 1, CHCl ₃)	-49.6 (c 1, CHCl ₃)	-63.8 (c 1, CHCl ₃)
EM-ES (m/z)	536 [M ⁺ +1]	536 [M ⁺ +1]	436 [M ⁺ +1]	436 [M ⁺ +1]	627 [M ⁺ +1]	627 [M ⁺ +1]
¹ H-RMN ^{a, b}						
R₁	1.46 (s) ^d	1.46 (s) ^d	---	---	4.05 y 3.92 (ABX, -17.1, 4.9, 3.9) ^e	4.06 y 3.89 (ABX, -17.6, 5.1, 3.8) ^e
Pro						
H _α	3.92 (m)	4.11 (m)	4.43 (m)	4.41 (m)	4.16 (m)	4.34 (m)
CHCN	4.37 (m)	3.99 (m)	5.30 (m)	5.22 (m)	4.43 (dd, 10.7, 4.9)	4.15 (d, 3.1)
H _δ	3.44 y 3.35 (m)	3.49 y 3.37 (m)	3.50 y 3.31 (m)	3.56-3.21 (m)	3.51-3.45 (m)	3.56-3.37 (m)
Glu						
H _α	3.39 (m)	3.56 (m)	4.95 (m)	4.91 (m)	3.43 (m)	3.54 (dd, 8.2, 5.0)
H _γ	2.44 (t, 7.3)	2.50 (t, 7.5)	2.45 (m)	2.54-2.47 (m)	2.48-2.38 (m)	2.47 (t, 7.3)
¹³ C-RMN ^a						
R₁						
CO	154.7	155.7	---	---	167.9	168.6
C _α	28.3	28.3	---	---	43.7	43.7
Pro						
C _α	59.1	59.1	59.6	58.5	59.4	59.6
CHCN	52.3	53.2	46.7	46.9	51.0	52.3
CN	118.8	118.5	113.9	117.2	118.5	118.2
Glu						
CO _α / CO _γ	172.5 / 173.4	172.6 / 173.2	171.3 / 177.1	172.8 / 183.2	172.5 / 173.2	172.6 / 173.0
C _α	59.2	58.3	61.1	60.3	59.4	58.6

a) Los espectros de (*R*)- y (*S*)-**147** y (*R*)- y (*S*)-**150** fueron realizados en muestras disueltas en CDCl₃ a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN, mientras que para (*R*)- y (*S*)-**148** se realizaron a 300 MHz para ¹H-RMN y 75 MHz para ¹³C-RMN. Valores de desplazamiento químico en ppm. b) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). c) Compuesto recrystallizado en Et₂O/Hexano. d) Desplazamiento químico del grupo ¹Bu. e) Desplazamiento químico de los H_α de la Gly.

Tabla 5.18. Datos espectroscópicos más característicos de las 2-oxopiperazinas derivadas de GlyΨ[CH(CN)NH]Glu **156**, **158** y **160**.



	(<i>R</i>)- 156	(<i>S</i>)- 156	(<i>R</i>)- 158	(<i>S</i>)- 158	(<i>R</i>)- 160	(<i>S</i>)- 160
R ¹	H	H	CH ₂ CO ₂ ¹ Bu	CH ₂ CO ₂ ¹ Bu	H	H
R ²	H	H	H	H	CH ₂ CO ₂ ¹ Bu	CH ₂ CO ₂ ¹ Bu
¹ H-RMN ^{a, b}						
H ₂	2.38 (t, 7.2)	2.39-2.32 (m)	2.41-2.32 (m)	2.38 (t, 7.2)	2.47 (t, 7.5)	2.30-2.33 (m)
H ₃	2.10 y 1.91 (m)	2.15 y 1.96 (m)	2.18 y 1.99 (m)	2.13 y 1.95 (m)	2.14-1.94 (m)	2.06-1.98 (m)
H _{1'}	6.80 (m)	6.79 (m)	---	---	6.56 (m)	6.66 (m)
H _{3'}	3.40 (m)	3.46 (dd, 6.8, 4.4)	3.53 (dd, 6.8, 4.5)	3.46 (dd, 9.4, 4.5)	3.32 (m)	3.46 (t, 5.4)
H _{5'}	3.15 (m)	3.13-3.00 (m)	3.17 (m)	3.28 (m)	3.28 (m)	3.33 (m)
H _{6'}	3.35 y 3.03 (m)	3.13-3.00 (m)	3.28-3.14 (m)	3.37-3.19 (m)	3.34 y 3.22 (m)	3.28-3.22 (m)
H _{1''}	3.11-3.00 (m)	3.13-3.00 (m)	3.20 y 3.10 (m)	3.26 y 3.11 (m)	3.37 y 2.99 (m)	3.23-3.11 (m)
R ¹ -H ^c	---	---	3.99 y 3.92 (AB, -17.2)	4.11 y 3.84 (AB, -17.1)	---	---
R ² -H ^c	---	---	---	---	3.41 y 3.06 (AB, -16.6)	3.40 y 3.38 (AB, -15.1)
¹³ C-RMN ^a						
C ₁	172.9	173.0	172.8	172.7	172.9	173.1
C ₂	32.5	31.8	31.9	32.6	31.7	31.2
C ₃	26.9	27.1	27.6	27.2	25.1	27.4
C _{2'}	172.6	171.8	170.0	170.1	172.2	171.9
C _{3'}	55.6	57.8	58.2	55.6	62.7	62.6
C _{5'}	47.4	52.2	52.2	48.1	51.9	55.8
C _{6'}	45.5	45.7	52.1	51.5	41.4	42.4
C _{1''}	42.3	43.1	43.1	42.3	39.5	41.3
R ¹ -C ^c	---	---	---	---	49.1	49.2
R ² -C ^c	---	---	53.8	50.9	---	---

a) Todos los espectros de fueron realizados a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN en muestras disueltas en CDCl₃. Valores de desplazamiento químico en ppm. b) Entre paréntesis: (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz). c) Desplazamiento químico del CH₂.